

アフリカツメガエル卵胞細胞の
卵胞刺激ホルモン受容体刺激やアデノシン受容体刺激で
発生する K^+ 電流応答に対するインスリンの抑制作用

藤田玲子¹⁾, 木村眞吾²⁾

¹⁾ 岩手医科大学全学教育推進機構・教養教育センター化学科

²⁾ 岩手医科大学生理学講座統合生理学分野

(Received on April 1, 2017 & Accepted on August 24, 2017)

要旨

アフリカツメガエルの卵胞細胞に卵胞刺激ホルモン (FSH) とアデノシン (Ade) をそれぞれ灌流投与して受容体を刺激すると, 膜電位固定法下ではいずれも K^+ 電流応答が発生する. これは, 受容体と couple している三量体 G タンパク質 (Gs) が活性化して adenylate cyclase (AC) が cAMP を産生し, 続いて protein kinase A (PKA) が活性化した結果, ATP sensitive K^+ channel (K_{ATP} channel) が開くことによる. これらの受容体を介して発生した K^+ 電流応答は, 100 nM インスリンを灌流により前投与すると, いずれも著しく抑制された.

cAMP の細胞内注入で発生した K^+ 電流応答は同様にインスリンの前投与で抑制されたが, K^+ チャネル開口薬 cromakalim の灌流投与で発生する K^+ 電流応答は抑制されなかった. さらに, protein tyrosine phosphatase を抑制する phenylarsine oxide を前投与すると, 受容体刺激で発生する K^+ 電流応答はインスリンの場合と同様に著しく抑制された. これらの結果から, インスリンの作用部位は産生した cAMP が PKA と結合する過程から K_{ATP} channel が開くまでの間であると示唆された.

Key words : *insulin, K_{ATP} channel, FSH, adenosine, *Xenopus oocyte**

I. 緒 言

膵臓 β -cell にある ATP sensitive K^+ channel (K_{ATP} channel) は sulfonylurea receptor 1 (SUR1) と Kir6.2 channel から構成され, インスリン分泌において重要な役割を果たしている¹⁾. 血糖値の上昇に伴って β -cell の ATP 濃度が増加すると, 細胞の K_{ATP} channel を構成する SUR1 に ATP が結合して SUR1 の立体構造が変化し, 安静状態で開いている K_{ATP} channel が閉じる. これによって, β -cell は脱分極して voltage-gated Ca^{2+} channel が開き, 細胞内

Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が増大する. その結果生じる分泌顆粒の exocytosis により, インスリンが分泌される²⁾. 分泌されたインスリンは血流により全身に運ばれる一方, β -cell のインスリン受容体と結合して phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) の活性化を介して K_{ATP} channel を開き, autocrine の作用によってインスリン分泌を抑制する³⁾. さらにインスリン受容体刺激後 protein kinase C (PKC) が活性化すること⁴⁾, β -cell の K_{ATP} channel を構成する Kir6.2 channel は PKC により活性化する性質がある⁵⁾ ことから, インスリンには PKC の活性化を介して β -cell の K_{ATP} channel を開く作用を持つ可能性がある.

Corresponding author: Reiko Fujita
rfujita@iwate-med.ac.jp

このようなインスリン受容体刺激による KATP channel 増強作用は, ラット大動脈の血管平滑筋細胞やアフリカツメガエル卵胞細胞でも報告されている^{6,7)}.

今までに我々は, アフリカツメガエル卵胞細胞に KATP channel が存在し, この channel が三量体 G タンパク質 (G_s) に couple する受容体刺激, 例えば, 卵胞刺激ホルモン (FSH) やアデノシン (Ade) 投与による adenylate cyclase (AC) の活性化を介した細胞内の cyclic adenosine 5', 3'-monophosphate (cAMP) 濃度の上昇による protein kinase A (PKA) の活性化によって開くことを報告している^{8,9)}. また, この卵胞細胞には三量体 G タンパク質 ($G_{q/11}$) に couple する purinergic receptor (P2Y) 受容体も存在しており, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) を介して小胞体から Ca^{2+} 放出によって細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が増大して Ca^{2+} 依存性 Cl^- channel が開くことも報告している⁸⁾.

我々は今回, 膜電位固定下でアフリカツメガエル卵胞細胞に FSH または Ade を投与して, FSH 受容体または Ade 受容体を刺激することによって KATP channel が開いて発生した K^+ 電流応答が, いずれもインスリンの前投与により抑制されることを発見した. この観測結果は, インスリンが β -cell とは異なる作用機序で K^+ 電流応答を抑制していることを示唆している. 本報告では, インスリンが細胞内情報伝達経路のどの部位に作用して K^+ 電流応答を抑制しているのかを明らかにし, インスリンの役割を検討した.

II. 研究材料および方法

1. 標本と灌流液

アフリカツメガエル成熟雌を 0.15% 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate (tricain) 水溶液で麻酔後, 腹部を切開して卵巣から卵細胞の房を取り出した. 続いて, 顕微鏡下でピンセットを用いて卵巣上皮細胞をはがして卵胞細胞層に覆われた卵母細胞 (follicle-

oocyte) を取り出した. これらを Barth's solution⁸⁾ に 15 °C で保存して 4 日以内に実験に使用した. この follicle-oocyte を灌流用 chamber に固定して, アフリカツメガエル用細胞外液 (frog Ringer's solution) で常に灌流した⁸⁾.

2. 試薬

adenosine (Ade), follicle stimulating hormone (FSH), (\pm) -*trans*-6-Cyano-3,4-dihydro-2,2-dimethyl-4-(2-oxopyrrolidin-1-yl)-2*H*-1-benzopyran-3-ol (cromakalim), uridine 5'-triphosphate (UTP), (3*R*, 4*aR*, 5*S*, 6*S*, 6*aS*, 10*S*, 10*aR*, 10*bS*)-6, 10, 10*b*-trihydroxy-3, 4*a*, 7, 7, 10*a*-pentamethyl-1-oxo-3-vinyldodecahydro-1*H*-benzo[*f*]chromen-5-yl acetate (forskolin) は frog Ringer's solution に溶解して使用した. phenylarsine oxide (PAO) は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解後, DMSO の最終濃度が 0.05% 以下になるように frog Ringer's solution で希釈して用いた. インスリンは 40 mM の塩酸に溶解後, 塩化水素の最終濃度が 10^{-6} M 以下になるように frog Ringer's solution で希釈して用いた. 実験に用いたインスリン希釈液の pH は frog Ringer's solution と同じ pH7.4 であった.

FSH は MSD (東京 千代田区), Ade, cromakalim (Cro), UTP, PAO, インスリン, adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cAMP), forskolin (Fors) は Sigma Aldrich (Mo. St Louis) の製品を用いた. その他の試薬は和光純薬 (大阪 中央区) の製品を用いた.

3. 電気生理学的測定

卵母細胞と卵胞細胞は gap junction でつながっており⁸⁾, 電気生理学的には同一細胞のように観測される. このため, 本実験では二本の電極を卵母細胞に刺入して, 卵胞細胞で発生する電気的な応答を間接的に測定した⁸⁾. 測定は Dagan 8500 膜電位固定装置, または, Dagan TEV-200 膜電位固定装置を用いて, 細胞の静止膜電位 (-60mV) に膜電位を固定し, 受容体刺激による電流応答を記録した.

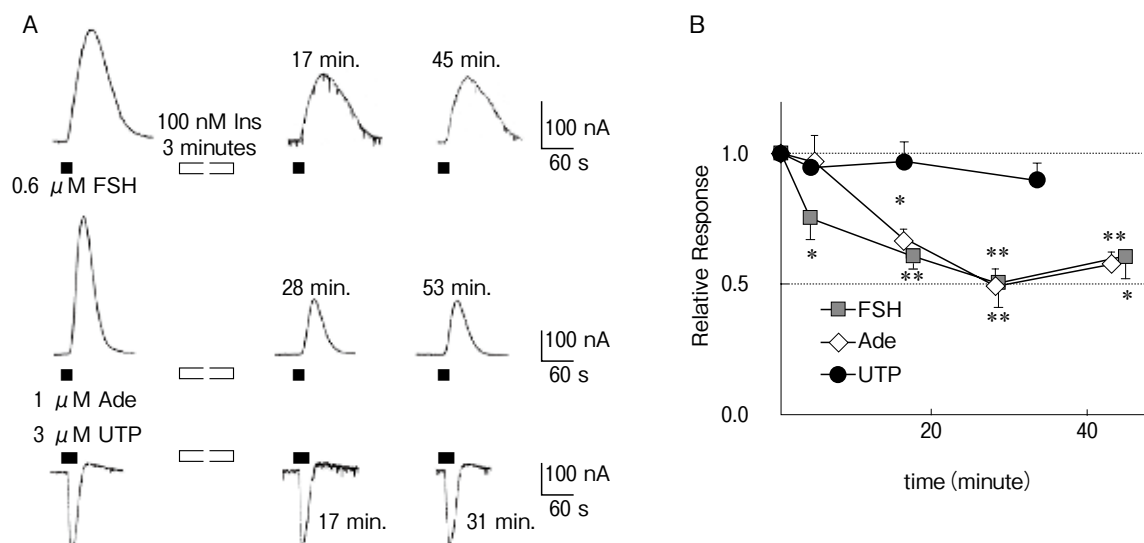


Fig. 1. Effects of insulin on the FSH- and Ade-induced K^+ current responses, and UTP-induced Cl^- current response.

A: The left traces are control responses to 0.6 μM FSH, 1 μM Ade, and 3 μM UTP, respectively. The second traces are test responses to the FSH, Ade, and UTP examined after the application of 100 nM insulin for 3 min. The third traces are recovery responses obtained after washing out of insulin for indicated times.

B: Time courses of the effects of insulin on 0.6 μM FSH-, 1 μM Ade- and 3 μM UTP-induced responses. The ordinate indicates test responses to FSH, Ade and UTP after the application of insulin for 3 minutes, expressed as relative value to the controls recorded before the application of 100 nM insulin. Each point with a vertical bar represents the mean value with SEM for 3-8 responses recorded from different oocytes. Symbol “**” and “*” indicate the statistical significances with $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

4. 試薬の投与の仕方

1) 細胞外投与

frog Ringer's solution に溶かした各試薬溶液は、細胞の外側から灌流にて投与した。Ade, FSH, UTP 溶液の投与時間は、その濃度で応答の最大値が得られる最小時間とした。

2) 細胞内投与 (細胞内圧注入)

cAMP の細胞内投与は KCl 水溶液に溶かして調製した 10 mM cAMP-100 mM KCl 溶液をガラス微小電極に詰め、follicle-oocyte に電極を刺入して圧力 0.2-3 kg/cm^2 で時間幅 100-600 ms の pressure pulse により行った⁸⁾。

5. 統計解析

全測定値は統計的に処理し、平均 \pm 標準誤差として表した。control 応答に対する test 応答

の有意差は Student's *t*-test を用いて検定して $p < 0.05$ を有意差ありとした。

6. 動物の取り扱い

動物の取り扱いは日本生理学会の「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」(平成 27 年 4 月 1 日改定) に則り処理した。

III. 結 果

1. FSH 応答や Ade 応答に対するインスリンの作用

follicle-oocyte に 100 nM インスリンを 3 分間前投与した後、FSH を灌流投与して FSH 受容体を刺激して発生する K^+ 電流応答 (FSH 応答) 並びに Ade を灌流投与して Ade 受容体を刺激して発生する K^+ 電流応答 (Ade 応答) は、

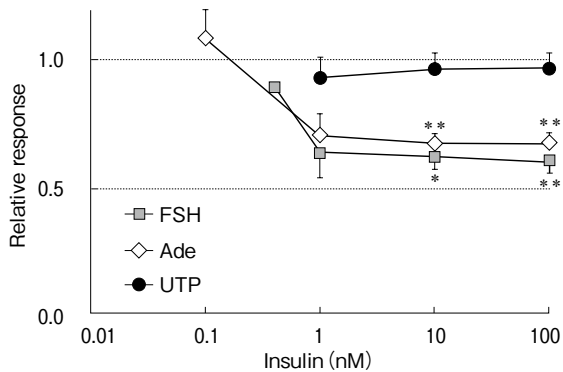


Fig. 2. Dose inhibition curves for insulin on 0.6 μ M FSH-, 1 μ M Ade-induced K^+ current responses, and 3 μ M UTP-induced Cl^- current response.

The ordinate indicates the mean amplitude of the test responses examined 15-20 min after application of varying concentrations of insulin. The test responses are expressed as a relative value to the control obtained before the application of insulin. Abscissa shows concentration of insulin in logarithmic scale. Each point with a vertical bar represents the mean \pm SEM for 3-8 responses recorded from different oocytes. Symbol "***" and "*" indicate the statistical significances with $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

ともに著しく抑制された (Fig.1A). これに対して, UTP を灌流投与して P2Y 受容体を刺激して発生した Cl^- 電流応答 (UTP 応答) はインスリン前投与によってほとんど変化しなかった (Fig.1A). インスリン投与前に測定した FSH 応答, Ade 応答や UTP 応答を control 応答として, これらの電流最大値 (peak 値) に対するインスリン投与後のそれぞれの応答 peak 値の相対値を縦軸に, インスリン投与開始からの時間を横軸にしてインスリン効果の time course を示した (Fig.1B). FSH 応答は3分間のインスリン投与終了直後から抑制が見られ, 約30分後では 0.50 ± 0.09 ($n=4$) と最大の抑制を示した. これに対して, Ade 応答はインスリン投与直後には変化が見られなかったが, 約15分後には FSH 応答とほぼ同程度の抑制が見られ, 約30

分後には 0.47 ± 0.07 ($n=7$) と FSH 応答の場合と同様に最大抑制を示した. インスリン投与後約45分では FSH 応答と Ade 応答は, ともに回復傾向を認めたが frog Ringer's solution で2時間灌流しても control 応答の電流値まで回復しなかった (データは示していない). これらの結果から, 今後の測定はインスリン投与から約15分後に得られた各応答 (FSH 応答, Ade 応答や UTP 応答) を指標として行うこととした.

2. インスリン作用の濃度依存性

インスリンの FSH 応答と Ade 応答に対する抑制作用の濃度依存性を調べた. インスリン濃度を横軸に, 縦軸には各 control 応答に対するインスリン投与から15分後の各応答の peak 値の比を表した (Fig.2). FSH 応答と Ade 応答は 0.1 nM や 0.4 nM のインスリン3分間の前投与では, それぞれ 0.90 ($n=2$), 1.09 ± 0.11 ($n=6$) とほとんど変化は見られなかったが, 1 nM のインスリン前投与では, それぞれ 0.64 ± 0.10 ($n=5$), 0.71 ± 0.08 ($n=3$) と抑制が見られた. 100 nM では, 1 nM の抑制の割合と同様にそれぞれ 0.61 ± 0.05 ($n=4$), 0.68 ± 0.04 ($n=6$) と前投与による抑制が認められた. これに対して, UTP 応答は 1 nM ~ 100 nM のインスリン前投与では, 有意に変化しなかった.

これらの結果から, インスリンの抑制作用の検討に 100 nM のインスリンを3分間前投与して, 投与前の control 応答と比較し検証することとした.

3. cAMP 細胞内注入や K_{ATP} channel 開口薬投与で発生した K^+ 電流応答に対するインスリンの作用

アフリカツメガエル卵胞細胞において Gs 活性化以降の細胞内情報伝達分子に対するインスリンの作用を明らかにするため以下の3つの実験を行った. 1. AC を活性化する Fors¹⁰ を投与して発生する K^+ 電流応答 (Fors 応答), 2. PKA を活性化する cAMP を細胞内に直接注入して発生する K^+ 電流応答 (cAMP 応答), 3.

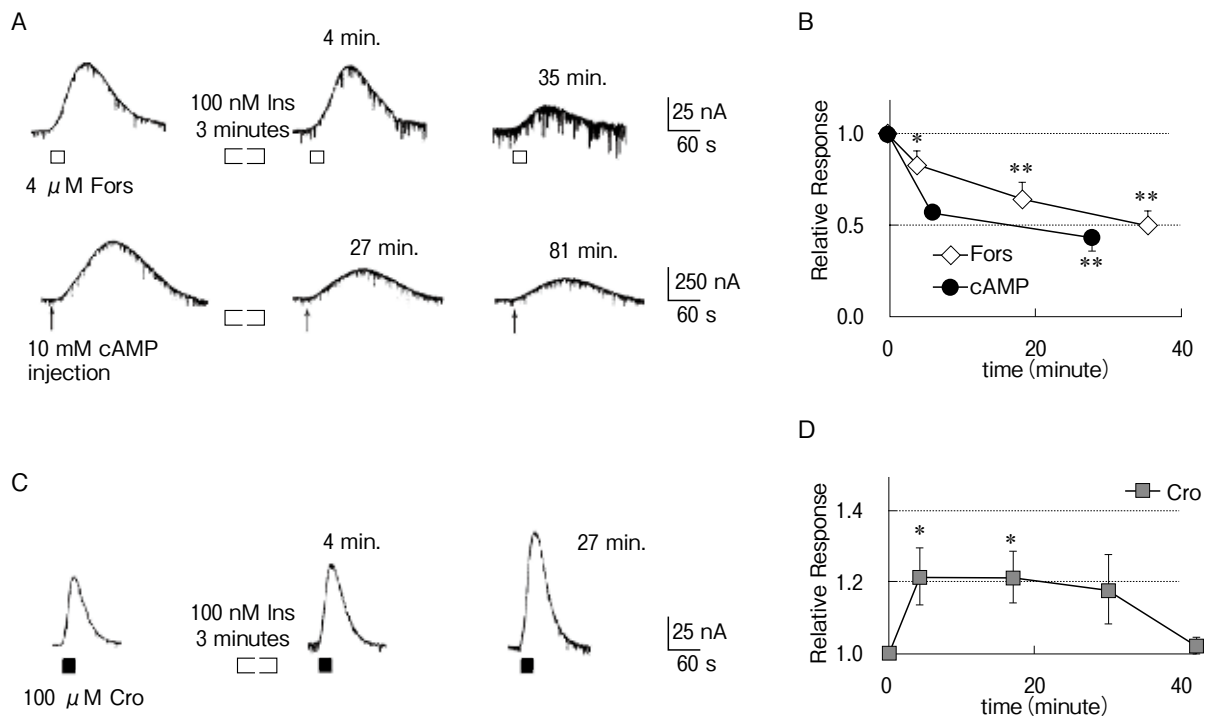


Fig. 3. Effects of insulin on the Fors-, cAMP-, and Cro-induced K^+ current responses.

A and C: The left traces are control responses to $4 \mu\text{M}$ Fors, 10 mM cAMP, and $100 \mu\text{M}$ Cro, respectively. The second traces are test responses to the Fors, cAMP, and Cro examined after the application 100 nM insulin for 3 min. The third traces are recovery responses obtained after application of insulin for indicated times. The intracellular concentration of cAMP was estimated to be $10 \mu\text{M}$.

B and D: Time courses of the effects of insulin on the $4 \mu\text{M}$ Fors-, 10 mM cAMP- and $100 \mu\text{M}$ Cro-induced responses. The ordinate indicates the relative responses of Fors, cAMP and Cro after application of 100 nM insulin for 3 minutes to the control response measured before application of insulin. Each point with a vertical bar represents the mean \pm SEM for 3-8 responses recorded from the different oocytes. Symbol “***” and “*” indicate the statistical significances with $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

KATP channel 開口薬の Cro¹¹⁾ を投与して KATP channel を直接開いて発生する K^+ 電流応答 (Cro 応答) の 3 つの応答に対する 100 nM インスリンの作用を検討した (Fig.3). Fors 応答と cAMP 応答はインスリンの前投与直後から抑制された。インスリン投与前に得られた Fors 応答, cAMP 応答, Cro 応答の各応答を control 応答として, それぞれの control 応答の peak 値と, インスリン投与後に得られたそれぞれの応答の peak 値の比を求めると, Fors 応答はインスリン投与約 18 分後には 0.67 ± 0.11 ($n=6$), cAMP 応答は約 28 分後には 0.43 ± 0.07 ($n=3$) となり (Fig.3A, 3B), 60 分後でも, この抑

制は持続した (データは示していない)。一方, Cro 応答はインスリン投与直後 4 分では 1.22 ± 0.08 ($n=8$) と有意に増強 ($p < 0.05$) した (Fig.3C)。この増強は約 20 分持続したが, 約 40 分後には回復した (Fig.3D)。

4. K^+ 電流応答に対するチロシン脱リン酸化酵素阻害剤の効果

インスリン受容体は protein tyrosine kinase (PTK) を分子内にもつ受容体で, 受容体が活性化すると tyrosine (Tyr) 残基の自己リン酸化が起き, これに insulin receptor substrate (IRS) などのアダプタータンパクが結合する。IRS は PTK でリン酸化され, 続いて PI3K の

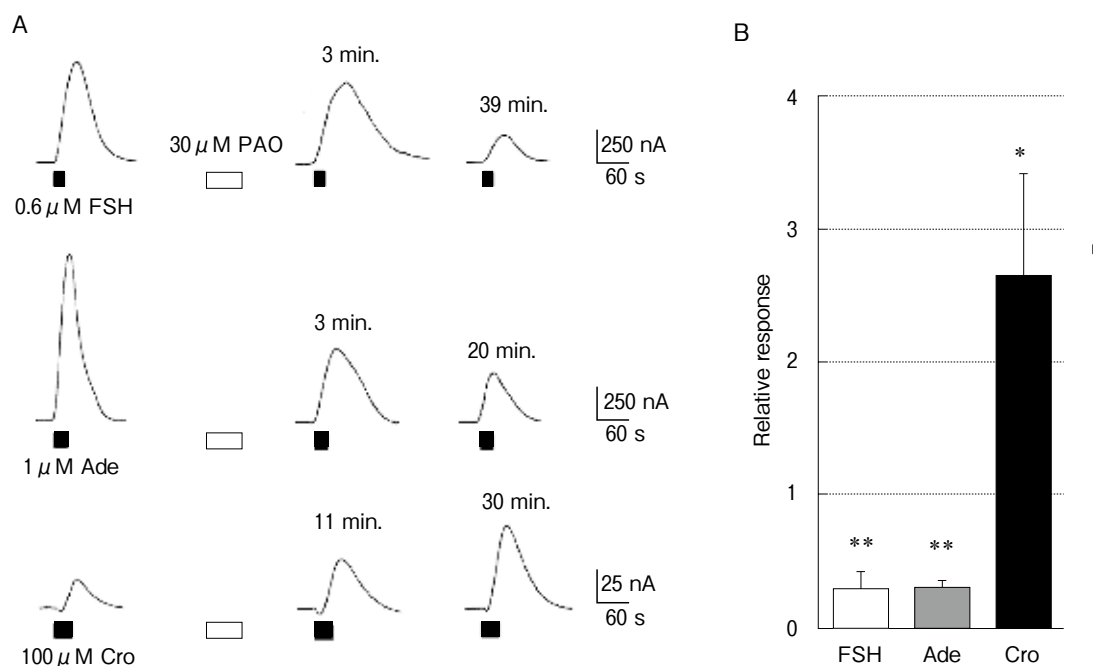


Fig. 4. Effects of phenylarsine oxide (PAO) on the FSH-, Ade-, and Cro- induced current responses.

A: The left traces are control responses to 0.6 μM FSH, 1 μM Ade, and 100 μM Cro, respectively. The second traces are test responses to the FSH, Ade, and Cro examined after the application of 30 μM PAO for 1 min. The third traces are responses obtained after application of PAO for indicated times.

B: Summary of the results obtained from 5 similar experiments as shown in A. Responses were normalized by the peak values of the control response. The test responses were examined recorded 15-30 min after application of 30 μM PAO applied for 1 min. Symbol “**” and “*” indicate the statistical significances with $p < 0.01$ and $p < 0.05$, respectively.

調節サブユニット分子内の SH2 domain が結合して PI3K が活性化し、次々と下流の分子へ情報が伝達されていく^{4, 12)}。一方、PTK でリン酸化された分子は protein tyrosine phosphatase (PTP) によって直ちに脱リン酸化され、この脱リン酸化された分子は情報を伝達することはできない。したがって、PTP の活性が抑制されれば、細胞内に Tyr 残基がリン酸化した分子が安静状態より増加するためインスリンの作用を疑似できると考えた。そこで、FSH 応答、Ade 応答、Cro 応答に対して PTP の不可逆的抑制剤の PAO¹³⁾ の効果を調べることにした。

30 μM PAO を灌流により 1 分間前投与すると、インスリン前投与と同様に FSH 応答や Ade 応答は著しく抑制され、これとは対照的に Cro 応答は増大した (Fig.4A)。PAO 投与前に

得られた FSH 応答、Ade 応答、Cro 応答の各応答を control 応答として、それぞれの control 応答の peak 値と、PAO 投与後に得られたそれぞれの応答の peak 値の比を求めると、PAO 投与後 15 分～20 分の FSH 応答、Ade 応答や Cro 応答では、それぞれ、 0.30 ± 0.12 ($n=5$)、 0.36 ± 0.05 ($n=5$)、 2.65 ± 0.77 ($n=5$) となり、インスリン投与後 15 分～20 分の作用とほぼ一致した (Fig.4B)。

IV. 考 察

1. インスリンの作用機序

1) インスリンによる抑制作用部位

Fig.3A に示したように、cAMP 応答がインスリン前投与で抑制されていることから、インスリンの作用部位はこれより上流に介在する受

容体や Gs, AC ではなく, cAMP 産生以降であることが示唆される. しかし, Cro 応答に対してインスリンは増大作用を示したことから, インスリンは K_{ATP} channel に作用して FSH 応答や Ade 応答を抑制したのではなく, むしろ, K_{ATP} channel の開口を促進したと考えられる. 以上の結果から, インスリンは受容体刺激によって産生した cAMP が PKA と結合する過程から K_{ATP} channel が開くまでの経路を抑制していることが示唆された.

cAMP により活性化する PKA は触媒部位と調節部位から構成され, 不活性時には調節部位が触媒部位の酵素作用を抑制している. cAMP が調節部位に結合すると触媒部位が活性化する¹⁴⁾. PKA の調節部位は plasma membrane に近接して存在する anchoring protein と結合し¹⁵⁾, また, この anchoring protein は AC と複合体を形成して PKA 活性を効率的に調節しているとの報告がある¹⁶⁾. 一方, 血中インスリン濃度が高い hyperinsulinemia のラット脂肪細胞では, インスリンにより PKA 調節部位と anchoring protein との結合が阻害され, その結果, AC と調節部位の物理的距離が拡大して cAMP と PKA 調節部位の結合確率が低下し, control に比べて PKA 活性化が低下すると推論されている¹⁷⁾. このような PKA と anchoring protein との結合を抑制するインスリンの作用がアフリカツメガエル卵胞細胞で起きると, 我々の結果と同じく K⁺ 電流応答の抑制が生じる可能性がある. しかし, この結果はインスリンの長期投与 (8 時間) による作用であり, 我々と同じ短期投与 (3 分間) の結果ではない. 今後更なる検討が必要である.

2) インスリンによる phosphodiesterase 増強の可能性

細胞内の cAMP は AC の活性化により産生され, phosphodiesterase (PDE) により 5'-AMP に分解される. したがって, 細胞内 cAMP 濃度 ([cAMP]_i) は AC と PDE の活性化量によっ

て変化する. これまでの研究で, インスリンはマウスなどの卵母細胞や脂肪細胞において PDE のサブタイプである PDE3 を特異的に増強することが報告されている^{18, 19)}. したがって, アフリカツメガエルの卵胞細胞においてもインスリンが PDE3 を増強して [cAMP]_i を減少させ, その結果, PKA の活性化を抑制して FSH 受容体刺激や Ade 受容体刺激による K⁺ 電流応答を抑制する可能性がある. 我々は以前に, アフリカツメガエル卵胞細胞において Ade 応答が PDE サブタイプである PDE4 の選択的抑制剤の rolipram (4-[3-(Cyclopentylloxy)-4-methoxyphenyl]-2-pyrrolidinone) 投与後に増大するが, PDE3 の選択的抑制剤の cilostamide (N-Cyclohexyl-4-[(1,2-dihydro-2-oxoquinolin-6-yl)oxy]-N-methylbutanamide) 投与後では変化がないことを報告した²⁰⁾. また, cilostamide 投与後, 続けてインスリンを投与すると Ade 応答は抑制され, Cro 応答は増大した (データは示していない). これはインスリン前投与のみで見られる Ade 応答と Cro 応答に対する作用と同じ結果であった. これらの結果は, 安静状態では, 卵胞細胞では活性化されている PDE3 がほとんど存在せず, さらに, インスリンによって増強される PDE3 もほとんど存在しないことを示唆している. したがって, アフリカツメガエルの卵胞細胞に存在する PDE3 の作用をインスリンが増強して FSH 応答や Ade 応答を抑制しているとは考えられない. 今後, その他の PDE のサブタイプに対するインスリンの作用を検討する必要がある.

3) インスリンの Cro 応答に対する作用

K_{ATP} channel を構成する SUR や Kir6 channel には PKA によりリン酸化されるアミノ酸残基がいくつか同定されており, リン酸化されると K_{ATP} channel が活性化される報告が多い²¹⁻²³⁾. また, β-cell において, インスリン受容体刺激によって PI3K が活性化して K_{ATP} channel が開くという報告もある³⁾. もし, ア

フリカツメガエル卵胞細胞の K_{ATP} channel が PI3K を介した細胞内経路で活性化すると仮定すると, 膜電位固定下ではインスリン受容体を刺激すると K^+ 電流が流れて base line が外向きへ変化するはずだが, 我々の実験では, むしろ base line のわずかな内向きへの変化が多く見られた。したがって, Cro 応答の増大には PI3K の活性化を介した K_{ATP} channel を開く作用は関与していないと考えられる。

今回のデータには示していないが, cromakalim と同じ K^+ channel 開口薬の pinacidil (*N*-Cyano-*N'*-(4-pyridinyl)-*N''*-(1,2,2-trimethylpropyl) guanidine) や PCO400 (3,4-Dihydro-3-hydroxy-2,2-dimethyl-4-[(4-oxo-2-cyclopentenyl) oxy]-2*H*-1-benzopyran-6-carbonitrile) の投与で K_{ATP} channel が開いて発生する K^+ 電流応答もインスリン前投与により増大した。これらの K^+ channel 開口薬の化学構造の特徴から, SUR に対する作用部位は同じ領域と考察されている²⁴⁾。したがって, インスリン投与後の増強作用は cromakalim の SUR に対する作用部位にインスリンが作用して K^+ 電流応答を増強したと考えられる。今後の検討が必要である。

2. 生理学的意義

実験に用いたアフリカツメガエル卵母細胞は stage IV で第一次減数分裂前期に停止している卵母細胞の生育期にあたる。アフリカツメガエル生体雌の摂食後のインスリン濃度は不明であるが, 空腹時濃度が約 0.05 nM という報告²⁵⁾が

あり, 摂食時にはインスリンによる抑制作用が発生する 1 nM の濃度に達している可能性がある。何れにしても, この時期の follicle-oocyte が仮に, 1 nM 程度でもインスリンに曝露されると, 卵胞細胞では FSH 刺激等で起きる $[cAMP]_i$ の増大には影響しないが, 発生する K^+ 電流は強く抑制される可能性がある。これまでの研究で, *Xenopus* oocyte を取り囲む卵胞細胞の K_{ATP} channel が開いて発生する K^+ 電流を抑制するとプロゲステロンやゴナドトロピンによる減数分裂再開が著しく低下すること^{26, 27)}, 卵母細胞の PKA 活性を抑制すると減数分裂が再開すること^{28, 29)}が報告されている。したがって, 今回示した受容体応答に対するインスリンの抑制作用が起きると, 卵胞細胞の K^+ 電流は抑制されるが, gap junction を介した卵母細胞への cAMP 供給は維持される。したがって, PKA の活性化が継続し, 減数分裂停止の状態が持続して排卵が抑制されることが予想される。

本研究にあたり, 松本光比古先生, 佐々木和彦先生, 川崎 敏先生には研究当初から暖かい激励と御指摘を頂きました。著者一同, 衷心より感謝申し上げます。

また, 研究の機会と研究機材を貸与して下さった本学生理学講座統合生理学分野の久保川学前教授(名誉教授)と病態生理学分野の佐原資謹教授のお二人に深く感謝申し上げます。

本研究の一部は平成 26 年度圭陵会学術振興会共同研究助成「課題番号 126 号」の援助によって行われた。

利益相反: 著者には開示すべき利益相反はない。

References

- 1) **Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, et al.**: Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion. *Science* **268**, 423-426, 1995.
- 2) **Straub SG and Sharp GW**: Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes Metab Res Rev* **18**, 451-463, 2002.
- 3) **Khan FA, Goforth PB, Zhang M, et al.**: Insulin activates ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic beta-cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Diabetes* **50**, 2192-2198, 2001.
- 4) **Shawl AI, Park KH and Kim UH**: Insulin receptor signaling for the proliferation of pancreatic β -cells: involvement of Ca^{2+} second messengers, IP_3 , NAADP and cADPR. *Islets* **1**, 261-223, 2009.
- 5) **Light PE, Bladen C, Winkfein RJ, et al.**: Molecular basis of protein kinase C-induced

- activation of ATP-sensitive potassium channels. Proc Natl Acad Sci USA **97**, 9058-9063, 2000.
- 6) **Yasui S, Mawatari K, Kawano T, et al.**: Insulin activates ATP-sensitive potassium channels via phosphatidylinositol 3-kinase in cultured vascular smooth muscle cells. J Vasc Res **45**, 233-243, 2008.
 - 7) **Sakuta H**: Potentiation by insulin and insulin-like growth factor-1 of glibenclamide-sensitive K⁺ currents in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. Eur J Pharmacol **268**, 375-380, 1994.
 - 8) **Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, et al.**: ATP suppresses the K⁺ current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. Jpn J Physiol **51**, 491-500, 2001.
 - 9) **Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, et al.**: Electrophysiological and pharmacological characterization of the K_{ATP} channel involved in the K⁺-current responses to FSH and adenosine in the follicular cells of *Xenopus* oocyte. J Physiol Sci **57**, 51-61, 2007.
 - 10) **Seamon KB, Daly JW, Metzger H, et al.**: Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives. J Med Chem **26**, 436-439, 1983.
 - 11) **Moreau C, Jacquet H, Prost AL, et al.**: The molecular basis of the specificity of action of K_{ATP} channel openers. EMBO J **19**, 6644-6651, 2000.
 - 12) **Du Y and Wei T**: Inputs and outputs of insulin receptor. Protein Cell **5**, 203-213, 2014.
 - 13) **Garcia-Morales P, Minami Y, Luong E, et al.**: Tyrosine phosphorylation in T cells is regulated by phosphatase activity: studies with phenylarsine oxide. Proc Natl Acad Sci USA **87**, 9255-9259, 1990.
 - 14) **Builder SE, Beavo JA and Krebs EG**: The mechanism of activation of bovine skeletal muscle protein kinase by adenosine 3',5'-monophosphate. J Biol Chem **255**, 3514-3519, 1980.
 - 15) **Hirsch AH, Glantz SB, Li Y, et al.**: Cloning and expression of an intron-less gene for AKAP 75, an anchor protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II beta. J Biol Chem **267**, 2131-2134, 1992.
 - 16) **Bauman AL, Soughayer J, Nguyen BT, et al.**: Dynamic regulation of cAMP synthesis through anchored PKA-adenylyl cyclase V/VI complexes. Mol Cell **23**, 925-931, 2006.
 - 17) **Zhang J, Hupfeld CJ, Taylor SS, et al.**: Insulin disrupts beta-adrenergic signalling to protein kinase A in adipocytes. Nature **437**, 569-573, 2005.
 - 18) **Han SJ, Vaccari S, Nedachi T, et al.**: Protein kinase B/Akt phosphorylation of PDE3A and its role in mammalian oocyte maturation. EMBO J **25**, 5716-5725, 2006.
 - 19) **Andersen CB, Roth RA and Conti M**: Protein kinase B/Akt induces resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. J Biol Chem **273**, 18705-18708, 1998.
 - 20) **藤田 (岩淵) 玲子, 木村真吾**: アフリカツメガエル卵胞細胞に対する PDE inhibitor の作用. 岩手医科大学教養部研究年報 第 50 号, 45-51, 2015.
 - 21) **Thorneloe KS, Maruyama Y, Malcom AT, et al.**: Protein kinase C modulation of recombinant ATP-sensitive K⁺ channels composed of Kir6.1 and/or Kir6.2 expressed with SUR2B. J Physiol **541**, 65-80, 2002.
 - 22) **Shi Y, Wu Z, Cui N, et al.**: PKA phosphorylation of SUR2B subunit underscores vascular K_{ATP} channel activation by beta-adrenergic receptors. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**, R1205-1214, 2007.
 - 23) **Tanaka K, Kawano T, Nakamura A, et al.**: Isoflurane activates sarcolemmal adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in vascular smooth muscle cells: a role of protein kinase A. Anesthesiology **106**, 984-991, 2007.
 - 24) **Koga H, Ohta M, Sato H, et al.**: Design of potent K⁺ channel openers by pharmacophore model. Bioorg Med Chem Lett **3**, 625-631, 1993.
 - 25) **Zinner MJ, Kasher F, Modlin IM, et al.**: Effect of xenopsin on blood flow, hormone release, and acid secretion. Am J Physiol **243**, G195-199, 1982.
 - 26) **Wibrand F, Honoré E and Lazdunski M**: Opening of glibenclamide-sensitive K⁺ channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. Proc Natl Acad Sci USA **89**, 5133-5137, 1992.
 - 27) **Oz M, Yang KH, Dinc M, et al.**: The endogenous cannabinoid anandamide inhibits cromakalim-activated K⁺ currents in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. J Pharmacol Exp Ther **323**, 547-554, 2007.
 - 28) **Tsafriri A, Chun SY, Zhang R, et al.**: Oocyte maturation involves compartmentalization and opposing changes of cAMP levels in follicular somatic and germ cells: studies using selective phosphodiesterase inhibitors. Dev Biol **178**, 393-402, 1996.
 - 29) **Wang J, Cao WL and Liu XJ**: Protein Kinase A (PKA)-restrictive and PKA-permissive phases of oocyte maturation. Cell Cycle **5**, 213-217, 2006.

Depressing effect of insulin on follicle stimulating hormone-
and adenosine-induced K^+ current responses
in the follicular cells of the *Xenopus* oocyte

Reiko FUJITA¹⁾ and Shingo KIMURA²⁾

¹⁾Department of Chemistry, Center of Liberal Arts & Sciences,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

²⁾Department of Physiology, School of Medicine,
Iwate Medical University, Yahaba, Japan

(Received on April 1, 2017 & Accepted on August 24, 2017)

Abstract

The follicular cells surrounding the *Xenopus* oocyte under voltage clamp produce K^+ current responses to follicle-stimulating hormone (FSH) and adenosine (Ade). FSH and Ade act at receptors coupled to the GTP-binding protein Gs to elevate ATP sensitive K^+ channel (K_{ATP} channel) activity via activation of cyclic AMP (cAMP)-dependent protein kinase (PKA). To characterize the K^+ channels involved in the FSH- and Ade-induced responses, we investigated the effects of insulin on the agonist-induced responses. The application of 100 nM insulin markedly and irreversibly depressed FSH- and Ade-induced responses in these cells. By contrast, this insulin did not affect the UTP-induced Cl^- current response in the same cells. The insulin also suppressed K^+

current responses induced by either the application of forskolin or intracellularly applied cAMP. On the other hand, K^+ current responses induced by cromakalim, a K_{ATP} channel opener, were augmented during the application of insulin. Furthermore, the application of 30 μ M phenylarsine oxide, a putative inhibitor of protein tyrosine phosphatase, also depressed the FSH- and Ade-induced K^+ current responses in a similar fashion to the insulin response. These results suggest that the depressing effects of insulin on the FSH- and Ade-induced K^+ current responses may be caused by the blocking of the reaction step between cAMP production and opening of the K_{ATP} channel, independently from the decrease of the cAMP concentration.
