

## アフリカツメガエル卵胞細胞に対するPDE inhibitorの作用

藤田(岩渕) 玲子<sup>1)</sup>, 木村 眞吾<sup>2)</sup>

(受理 2015年10月5日)

Effects of PDE inhibitors on the follicular cells of *Xenopus* oocyte

Reiko FUJITA and Shingo KIMURA

**Abstract**

The follicular cells of *Xenopus* oocyte under the voltage clamp produced  $K^+$  current responses to follicle stimulating hormone (FSH), adenosine (Ade) and cromakalim (Cro), which is a  $K^+$  channel opener. FSH receptor and Ade receptor were coupled together with Gs proteins in the follicular cells. These three responses were produced to open the  $K_{ATP}$  channel. To investigate three phosphodiesterase (PDE) inhibitors, isobutylmethylxanthine (IBMX), rolipram, cilostamide into the follicular cells, we utilized the FSH-, Ade- and Cro-induced responses for monitoring of increasing intracellular cyclic AMP concentration ( $[cAMP]_i$ ). FSH- and Cro-induced responses were augmented with a prior application of IBMX, a nonselective PDE inhibitor, whereas Ade-induced response was disappeared for an antagonist action of IBMX. FSH-, Ade- and Cro-responses were augmented with a prior application of rolipram, a selective PDE4 inhibitor, whereas could not increase with a prior application of cilostamide, a selective PDE3 inhibitor. These results suggest that PDE activates in the resting levels of the follicular cells and the activated PDE may be PDE4.

**1. Introduction**

cyclic AMP (cAMP) はsecond messengerとして細胞内で働く低分子で, adenylyl cyclase (AC) によりATPから生成される. GTP binding protein (Gタンパク質) のGsがcoupleしている受容体がagonist刺激により活性化に変化するとACは活性化し, 一方, Gタンパク質のGiがcoupleしている受容体がagonist刺激により活性化に変化するとACは抑制される.

細胞内cAMP濃度 ( $[cAMP]_i$ ) が増大するとprotein kinase A (PKA) にcAMPが結合してPKAが活性化する. 第一次減数分裂前期の卵母細胞ではPKAはCdc25をリン酸化してM-phase promoting factorを

---

<sup>1)</sup> 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

<sup>2)</sup> 岩手医科大学 生理学講座 統合生理学分野

down-regulateし, 減数分裂が停止している<sup>[1]</sup>. また, アフリカツメガエルの卵母細胞を取り囲んでいる卵胞細胞ではcAMPが結合して活性化したPKAは,  $K_{ATP}$  channelのopeningに寄与する<sup>[2]</sup>. この $K_{ATP}$  channelが開いて発生した $K^+$ 電流はアフリカツメガエル卵母細胞の減数分裂再開を抑制している<sup>[3]</sup>. このようにcAMPはPKAの活性を介して卵母細胞の成熟を調節している.

一方, 増加したcAMPは分解酵素のphosphodiesterase (PDE)で分解され,  $[cAMP]_i$ は細胞外からの刺激を受けていない静止状態 (rest状態)の濃度にもどる. すなわち, rest状態の細胞では一定量のACやPDEが活性化していて $[cAMP]_i$ はある一定の濃度に調節されていると考えられている. PDEにはPDE 1~11のサブタイプがあり, cAMPを特異的に分解するPDE 4, PDE 7, PDE 8, cGMPを特異的に分解するPDE 5, PDE 6, PDE 9, cAMPとcGMPを両方とも分解するPDE 1~3, PDE 10, PDE 11がある<sup>[4]</sup>. このうちPDE 3はアフリカツメガエルの卵母細胞ではインスリン受容体の活性化により増強され, この結果PKA活性が低下して減数分裂が再開すると報告されている<sup>[5]</sup>. 減数分裂の再開はPKCの活性化によっておこるといふ報告<sup>[6, 7]</sup>もあり, 卵母細胞成熟には複数の要因が働いていると考えられている. また, PDE 6は視細胞でtransducin (Gt)が光刺激で活性化型に変化すると活性化され, cGMPの細胞内濃度は減少する<sup>[8]</sup>. この結果, 視細胞の陽イオンチャネルが閉じて細胞が過分極してグルタミン酸の放出を抑制する. このように, PDEはcAMPやcGMPを介して細胞内情報伝達系にさまざまに関与している.

今回, アフリカツメガエル卵母細胞の成熟に関わっている卵胞細胞内のPDEのタイプを明らかにするために, 卵胞細胞に存在するGsとcoupleしている受容体応答をPDE inhibitorの作用で増大する $[cAMP]_i$ の指標として検討した.

## 2. Method

### ・標本と灌流液

アフリカツメガエル成熟雌を麻酔後, 腹部を切開して卵巣から卵母細胞の房を取り出し, ピンセットで卵巣内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 solution中, 15℃で保存して4日以内に実験した. 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)で灌流した. 詳細は参考文献を参照<sup>[9]</sup>.

### ・電気生理学的測定

oocyteとfollicular cellはgap junctionでつながっていて, 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oocyteに刺入して, follicular cellで発生する電気的な応答を間接的に測定した<sup>[9]</sup>. 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電圧固定法下で行なった.

### ・試薬

adenosine (Ade), follicle stimulating hormone (FSH), cromakalim (Cro)はfrog Ringer's solutionに溶解して用いた. 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), cilostamide, rolipram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.

### ・試薬の投与の仕方

frog Ringer's solutionに溶かした各試薬溶液は細胞の外側から灌流投与した. Ade, FSH溶液の投与時間はその濃度で応答の最大値が得られるまでの最小時間になるように調節した.

### 3. Results

#### 3-1 Gs couple受容体応答に対するIBMXの作用

[cAMP]<sub>i</sub>はcAMP生成酵素のACと分解酵素のPDEの活性度に依存し、この二つの酵素による動的平衡状態にあると考えられている。したがって、Gs couple受容体応答に対するPDE inhibitorの作用を検討することで細胞内のPDEの働きをモニターできると考えた。すなわち、rest状態のPDEの活性化が抑制されればcAMP量は増大し、その変化はGsとcoupleしている受容体応答の増強で確認できる。

アフリカツメガエルのfollicle-oocyteにFSHとAdeを投与すると、電圧固定法下ではFig. 1-A, Bのような外向き電流応答が得られた。FSHやAdeが受容体に結合すると受容体にcoupleしているGsが活性化して細胞内のACを活性化させる。その結果、[cAMP]<sub>i</sub>が増大してPKAは活性化し、K<sub>ATP</sub> channelが開いてK<sup>+</sup>電流応答が発生する<sup>[10]</sup>。PDE inhibitorの作用を調べるため、これらの応答を利用した。

non-selective PDE inhibitorの50 μM IBMXを10分間前投与した後、FSHを同時投与してFSH応答を確かめると、FSH応答はコントロールに比べ1.42±0.13 (n=4)に増大したが(Fig. 1-A, 1-D)、同じ投与方法ではAde応答は観測されなかった。IBMXはAde受容体のantagonistとして作用することが知られている<sup>[11]</sup>のでIBMXを10分間投与した後IBMXの投与を止めて外液をfrog Ringer's solutionに戻して5分後にAdeをfollicle-oocyteに投与するとAde応答は0.068±0.002 (n=5)に減少した(Fig. 1-B, 1-D)。

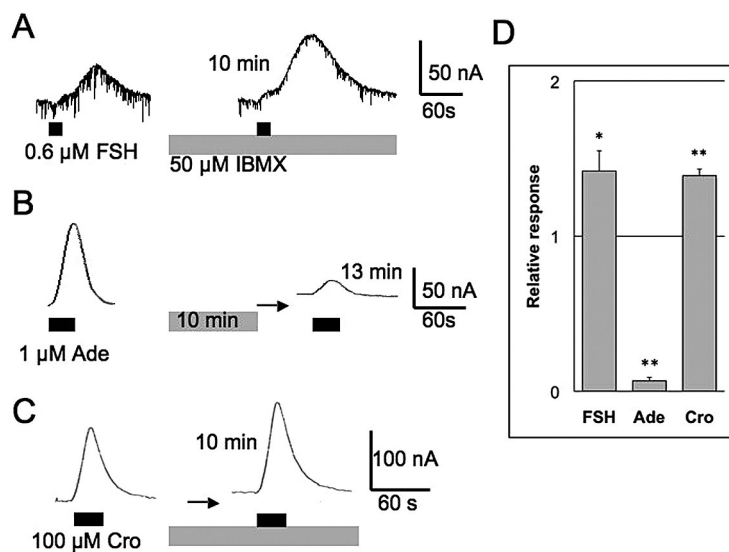


Fig. 1. Facilitatory effect of IBMX on the FSH (A)- and Cro (C)-induced K<sup>+</sup> current responses and depressing effect of IBMX on the Ade (B)-induced K<sup>+</sup> current response. The left traces are control responses to 0.6 μM FSH, 1 μM Ade, 100 μM Cro, respectively. The right traces (A and C) are test responses examined 10 minutes after the application of 50 μM IBMX, a non-selective inhibitor of PDE. The right trace of (B) is test response examined 15 minutes after the prior application of 50 μM IBMX for 10 minutes. Small arrows in the right traces (B) and (C) show base line level of the holding current of -61 mV and -52 mV, respectively. (D) The summary of the effects of IBMX on the FSH-, Ade- and Cro-induced responses. Responses to FSH, Ade and Cro after application of IBMX are expressed as relative values to the controls, respectively. Each data indicated the mean ± S.E.M. from 4-6 cells. \*Significant difference (\**p*<0.05, \*\**p*<0.01).

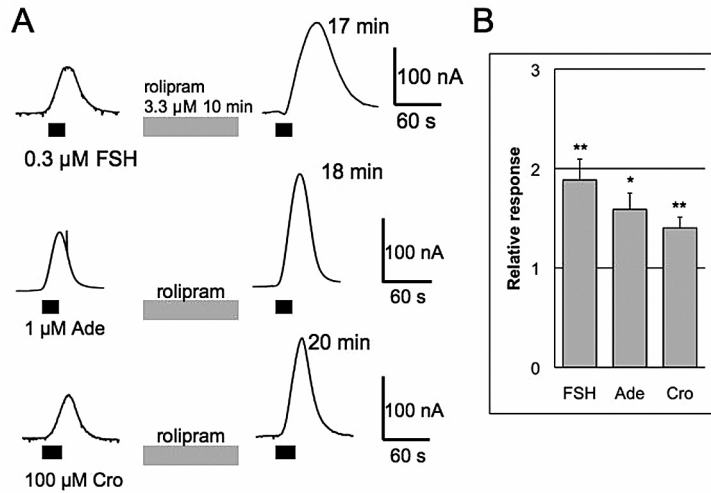


Fig. 2. Facilitatory effect of rolipram on the FSH-, Ade- and Cro-induced responses. (A) The left traces are control responses to 0.3 μM FSH (upper), 1 μM Ade (middle), 100 μM Cro (bottom), respectively. The right traces are test responses examined 17, 18 and 20 minutes after the prior application of 3.3 μM rolipram (a selective inhibitor of PDE4) for 10 minutes. (B) The summary of the effects of rolipram on the FSH-, Ade- and Cro-induced responses. Responses to FSH, Ade and Cro after application of rolipram are expressed as relative values to the controls, respectively. Each data indicated the mean ± S.E.M. from 4-6 cells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

IBMX以外のPDE inhibitorでもAde応答に対してantagonist作用を示す可能性があるため、IBMX以外のPDE inhibitorは持続投与ではなく10分間の前投与とした。

### 3-2 $K_{ATP}$ channelを開いて発生する $K^+$ 電流応答に対するIBMXの作用

アフリカツメガエルのfollicle-oocyteに $K_{ATP}$  channel openerのCroを投与すると、Gsとcoupleしている受容体応答と同じ $K^+$ 電流応答が得られた (Fig. 1-C)<sup>[10]</sup>。この応答に対するPDE inhibitorの作用を調べるため50 μM IBMXを10分間投与するとCro応答は $1.39 \pm 0.04$  (n=6) に増大した (Fig. 1-D)。

### 3-3 $K^+$ 電流応答に対するrolipramの作用

アフリカツメガエルの卵胞細胞で発現しているPDEは不明であるが、ウシやマウスの卵胞細胞にはPDE 4が発現していることから<sup>[10,11]</sup>、この卵胞細胞でもPDE 4が発現している可能性がある。そこで、PDE 4を特異的に抑制するrolipramの作用を検討した<sup>[14]</sup>。Fig. 2に示したように3.3 μMのrolipramをfollicle-oocyteに10分間投与すると、FSH、Ade、Cro応答はそれぞれ $1.89 \pm 0.21$  (n=6)、 $1.59 \pm 0.16$  (n=4)、 $1.40 \pm 0.11$  (n=6) に増大した。この増大作用は40分以上続いた。

### 3-4 $K^+$ 電流応答に対するcilostamideの作用

アフリカツメガエルの卵胞細胞が囲んでいる卵母細胞にはPDE 3が発現している<sup>[5]</sup> ことから、卵胞

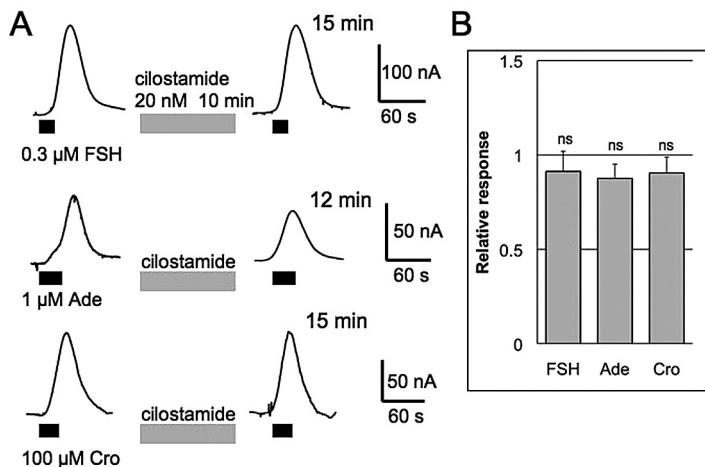


Fig. 3. Effect of cilostamide on the FSH-, Ade- and Cro-induced responses. (A) The left traces are control responses to 0.3 μM FSH (upper), 1 μM Ade (middle), 100 μM Cro (bottom), respectively. The right traces are test responses examined 15, 12 and 15 minutes after the prior application of 20 nM cilostamide (a selective inhibitor of PDE3) for 10 minutes. (B) The summary of the effects of cilostamide on the FSH-, Ade- and Cro-induced responses. Responses to FSH, Ade and Cro after application of cilostamide are expressed as relative values to the controls, respectively. Each data indicated the mean ± S.E.M. from 5-8 cells. ns,  $p > 0.05$ .

細胞にも発現している可能性がある。従って、PDE 3 の特異的なinhibitorのcilostamideを前投与する実験を行なった<sup>[14]</sup>。20 nMのcilostamideをfollicle-oocyte に10分間前投与すると、Fig. 3 に示すようにFSH, Ade, Cro応答はそれぞれ $0.91 \pm 0.11$  ( $n = 5$ ),  $0.88 \pm 0.08$  ( $n = 7$ ),  $0.91 \pm 0.08$  ( $n = 8$ ) とほとんど変化しなかった。

#### 4. Discussion

##### (1) PDEの細胞内活性

IBMXをfollicle-oocyteに投与するとFig. 1-BとFig. 1-Cに示したようにこれ自身で基線が外向きにシフトした。これはrolipramの投与後にも測定された(data not shown)。このとき、電流固定法を用いて膜抵抗変化をモニターすると膜抵抗が減少していることからチャネルが開いていることが解った。さらに、アフリカツメガエル卵胞細胞ではPKAが活性化すると $K_{ATP}$  channelが開くこと<sup>[2]</sup>から、この外向き電流は $K_{ATP}$  channelが開いて発生した $K^+$ 電流であることが推察される。これらのことから、PDE inhibitorの作用でrest 状態よりPKAが活性化し、 $K_{ATP}$  channelが開いたこと、また、rest状態の卵胞細胞ではPDEが一定量活性化していることが解った。

従って、PDE inhibitorの作用でrest 状態よりPKAが活性化し、さらに、受容体刺激で増加したcAMPにより活性化するPKAが増大するとFig. 1 やFig. 2 のようにFSHやAde応答が増強したと考えられる。

しかし、これらの受容体刺激で発生した応答の増大量はPDE inhibitor投与によって基線が外向きに

シフトした電流変化より著しく大きい。著者らは、このような増強作用をアフリカツメガエル卵胞細胞ですでに報告している<sup>[10]</sup>。すなわち、薄い濃度のAdeを投与して $[cAMP]_i$ が増大した状態でAde受容体と同じくGsとcoupleしているFSH受容体刺激を行なうとそれぞれのコントロール応答の電流値の和より増強した応答が得られた。しかし、この増強した応答はそれぞれの最大応答を超えずocclusionした。今回実験に用いたFSHやAde, Croの投与濃度は最大応答の50%以下の濃度であるため、PDE inhibitorによる増強作用が観測されたと考えられるので、それぞれの最大応答に対するPDE inhibitor増強作用がocclusionするかどうかを検討する必要がある。

## (2) アフリカツメガエル卵胞細胞内で働くPDEサブタイプ

今回用いたcilostamideとrolipramの $IC_{50}$ はそれぞれ20 nM, 1  $\mu$ Mであるので投与濃度はそれに近い値に設定した (cilostamide : 20 nM, rolipram : 3.3  $\mu$ M)。Fig. 2 -Bに示したようにrolipramの前投与によりAde応答とFSH応答はコントロールに対して有意に増大した( $p < 0.05$ )。これに対してcilostamideの効果には有意差が認められなかったことから、アフリカツメガエル卵胞細胞内のrest状態で活性化しているPDEのサブタイプはウシやマウスの卵胞細胞と同じPDE 4である可能性が高い<sup>[12, 13]</sup>。しかし、PDEには多数のサブタイプが存在することから、これ以外のPDEも活性化している可能性があり、今後さらに検討が必要である。

## (3) Cro応答に対するPDE inhibitorの作用

AdeやFSHを前投与していた卵胞細胞にさらにCroを同時に投与するとそれぞれのコントロール応答の電流値の和より増大することを以前報告した<sup>[10]</sup>。今回のPDE inhibitorの前投与でもAdeやFSHを前投与したときと同じく $[cAMP]_i$ が増大してrest状態より活性化しているPKAが増加して $K_{ATP}$ チャネルをリン酸化したと考えられる。これまでの我々の研究でリン酸化された $K_{ATP}$ チャネルはCroとのaffinityが増大することが解っていることから (data not shown), PDE inhibitorの投与後にCroが投与されるとより大きな $K^+$ 電流が発生したと考えられる。

## (4) IBMXのAde受容体への作用

Ade受容体サブタイプの $A_1$ や $A_2$  (purinoceptor 1)に対するantagonist作用はキサンチン構造を持つIBMXやtheophylline, caffeineに共通で、その $A_1$ 受容体に対するantagonist作用の $K_1$ 値は5.6  $\mu$ Mである<sup>[11]</sup>。また、IBMXのPDE inhibitorとしての $IC_{50}$ はPDE 3で18  $\mu$ M, PDE 4で13  $\mu$ Mである。今回、IBMXの持続投与ではPDEが抑制されてAde応答が増大する結果は得られなかった。しかし、同じ細胞において50  $\mu$ M IBMXを10分間前投与後にAdeとCroの各応答を調べると、Cro応答は増大したがAde応答は著しく抑制された。Cro応答の増大から、IBMXのPDE inhibitor作用で確かにPDEは抑制されて $[cAMP]_i$ は増大していたことが解る。このときのCro応答はIBMX投与終了後約30分後にコントロールレベルに戻った ( $1.07 \pm 0.03$ ,  $n = 3$ )。一方、Ade応答の抑制効果は60分以上持続した。以上の結果から、Ade受容体に対するIBMXの強力で持続的なantagonist作用によってPDE抑制効果がマスクされたためAde応答の増大効果が見られなかったと考えられる。

PDE inhibitorの中にはIBMXのようにAde受容体に対するantagonist作用を示すことも考えられるので、投与する際は注意が必要である。さらにAde受容体を含むpurine受容体に対するPDE inhibitorの投与でも同様の作用がおきることを予想して濃度や投与の時期を検討する必要がある。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり研究機材および研究室利用の機会を与えていただいた本学生理学講座統合生理学分野の久保川学教授並びに同生理学講座病態生理学分野の佐原資謹教授に衷心より感謝申し上げます。

## References

1. Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ: Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell cycle* **8**, 665-670 (2009)
2. Honoré E, Lazdunski M: Single-channel properties and regulation of pinacidil/glibenclamide-sensitive  $K^+$  channels in follicular cells from *Xenopus* oocyte. *Pflügers Arch* **424**, 113-121 (1993)
3. Wibrand F, Honoré E, Lazdunski M: Opening of glibenclamide-sensitive  $K^+$  channels in follicular cells promotes *Xenopus* oocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 5133-5137 (1992)
4. Kleppisch T: Phosphodiesterases in the central nervous system. *Handb Exp Pharmacol*. **191**, 71-92 (2009)
5. Sadler SE, Maller JL: In vivo regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. Stimulation by insulin and insulin-like growth factor 1. *J Biol Chem* **262**, 10644-50 (1987)
6. Bement WM, Capco DG: Parallel pathways of cell cycle control during *Xenopus* egg activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 5172-5176 (1991)
7. Rose-Hellekant TA, Bavister BD: Roles of protein kinase A and C in spontaneous maturation and in forskolin or 3-isobutyl-1-methylxanthine maintained meiotic arrest of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev* **44**, 241-249 (1996)
8. Fung BK, Hurley JB, Stryer L: Flow of information in the light-triggered cyclic nucleotide cascade of vision. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**, 152-156 (1981)
9. Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Takashima K, Matsumoto M, Hirano H, Sasaki K: ATP Suppresses the  $K^+$  Current Responses to FSH and Adenosine in the Follicular Cells of *Xenopus* Oocyte. *Jpn J Physiol* **51**, 491-500 (2001)
10. Fujita R, Kimura S, Kawasaki S, Watanabe S, Watanabe N, Hirano H, Matsumoto M, Sasaki K: Electrophysiological and pharmacological characterization of the  $K_{ATP}$  channel involved in the  $K^+$  current responses to FSH and adenosine. *J Physiol Sci* **57**, 51-61 (2007)
11. Shi D, Daly JW: Chronic Effects of Xanthines on Levels of Central Receptors in Mice. *Cell Mol Neurobiol* **19**, 719-732 (1999)
12. Thomas RE, Armstrong DT, Gilchrist RB: Differential effects of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors on bovine oocyte meiotic maturation. *Dev Biol* **244**, 215-225 (2002)
13. Tsafiriri A, Chun SY, Zhang R, Hsueh AJ, Conti M: 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)
14. Sasseville M, Albus FK, Côté N, Guillemette C, Gilchrist RB, Richard FJ: Characterization of novel phosphodiesterases in the bovine ovarian follicle. *Biol Reprod* **81**, 415-25 (2009)