

## 論文内容の要旨

Intracellular calcium dynamics and expression of P2Y and IP<sub>3</sub> receptors in a cycling G1-phase cell

(G1 間期における P2Y 受容体および IP<sub>3</sub> 受容体の発現と細胞内カルシウム動態の検討)  
(ガブリエル・ムコンデ, 佐藤洋一, 安平進士, 前沢千早, 齋野朝幸)

(Bioimages 24 巻 平成 28 年 12 月掲載)

### I. 研究目的

細胞はその性状や生体内での役割に応じて、それぞれ決まった周期で細胞分裂を繰り返して増殖している。細胞周期は、光学顕微鏡での観察に基づき、間期と M 期とに分けられる。間期はさらに G1 期, S 期, G2 期に分けられる。これまで細胞間期での  $[Ca^{2+}]_i$  動態の研究は間期と M 期の間, G1S 移行期, G2M 移行期での報告はあるが、この間期を通しての  $[Ca^{2+}]_i$  についての動態の詳細は不明である。本研究では、細胞周期を容易に観察可能な *HeLa. S-Fucci2* 細胞を用いた。この細胞にさらにカルシウム指示薬を導入し、間期における核および細胞質に着目し、双方の  $[Ca^{2+}]_i$  変動にどのような違いがあるのか比較検討することを目的とした。

### II. 研究対象ならび方法

*HeLa. S-Fucci2* 細胞を培養し、使用した。Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) は、細胞周期の進行を観察することができる蛍光プローブで、細胞周期の特定の時期にのみ存在する Geminin と Cdt1 という 2 つのタンパク質に、それぞれ緑色とオレンジ色の蛍光タンパク質を融合して細胞周期を可視化できるようにしている。Geminin は S/G2/M 期に増加し、G1 期には存在しない。一方 Cdt1 は G1 期に増加し、S/G2/M 期には存在しない。これらを細胞に導入すると、S/G2/M 期に緑色、G1 期にオレンジ色の蛍光が核に観察されることになる。この細胞周期が観察可能な標本を利用し、この細胞にさらにカルシウム感受性色素の Indo-1/AM を導入し、間期において核および細胞質の  $[Ca^{2+}]_i$  変動にどのような違いがあるのかを検討した。さらに、細胞種による違いがないかを Fucci マウスから取り出した線維芽細胞を用いて同様に検証した。詳細に細胞内ストアからの  $Ca^{2+}$  放出に関与するチャネルを調べるため、P2Y 受容体および IP<sub>3</sub> 受容体の発現を、RT-PCR 法を用いて間期の早期と後期に分けて検討を行った。

### III. 研究結果

細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  除去環境で、*HeLa. S-Fucci2* 細胞を ATP 刺激することで核および細胞質双方の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇が生じた。間期の G1 期での核と細胞質の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇値に着目して解析すると、①核の濃度が最初に上昇し、細胞質の濃度より上昇するもの、②双方パラレルに上昇するものの2つのパターンが存在した。この現象は Fucci マウスの線維芽細胞でも同様に認められた。この違いが何によるか検討を加えた。PLC 抑制薬の U73122,  $\text{IP}_3$  受容体阻害薬の xestospongin C 負荷によって ATP 誘発性の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇が完全に阻害された。P2 受容体阻害薬の suramin, P2Y 受容体阻害薬の reactive blue2 投与によっても同様であった。以上から細胞内からの  $\text{Ca}^{2+}$  放出が関与していることが示唆された。また、*HeLa. S-Fucci2* 細胞には P2Y 受容体が発現していることが示唆された。この違いが何らかの受容体の発現によるものか RT-PCR にて ATP および  $\text{IP}_3$  受容体の検討を行ったところ、P2Y 受容体は P2Y1, 2, 6, 12, 13, 14 の発現を認めた。 $\text{IP}_3$  受容体は  $\text{IP}_3\text{R1}$ ~3 全ての発現を認めた。以前にも報告した G1 と G1/S 以降の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇パターンの違いに長い G1 期の間のステージの違いが関係する可能性があることから、arcyriaflavin-A を用いて早期 G1 期で細胞周期を止めたもので受容体の発現を検討した。すると、P2Y1, 2, 12, 13, 14 の発現の低下、特に P2Y2 の消失を認めた。同様に  $\text{IP}_3$  受容体も  $\text{IP}_3\text{R1}$  の発現の低下を認めた。他の細胞でも検討したところ、*HeLa. S-Fucci2* 細胞とは別の Fucci マウスの線維芽細胞ではこれら受容体の発現パターンは異なっていた。特に、arcyriaflavin-A 処理にて別の受容体 (P2Y6, 12,  $\text{IP}_3\text{R2}$ ) の低下を認めた。特に *HeLa. S-Fucci2* 細胞でこれら受容体の低下についてさらに検討した。P2Y2, 4, 6 アゴニストである UTP 刺激によって、arcyriaflavin-A 処理 *HeLa. S-Fucci2* 細胞の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇は、未処理群と比較して抑えられていた。以上から、*HeLa. S-Fucci2* 細胞の G1 期での  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇のパターンの違いは、受容体の発現の違いによるところが大きいと考えられ、特に  $\text{IP}_3\text{R1}$  や P2Y2 受容体の発現の違いによって引き起こされている可能性が示唆された。

### IV. 結 語

本研究では今まで報告されていない細胞周期の間期、特に G1 期に着目し、その G1 期をさらに早期とそれ以外に分けることで、詳細に検討したものである。この G1 間期で核および細胞質の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇パターンに違いが起こり、この違いを引き起こす受容体のうち、特に重要なものは  $\text{IP}_3$  受容体で、その発現状態が異なることによって  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇に違いが起こると考えられた。今後、この間期の間で受容体が生成されたていくのか消失していくのか、詳細に検討する必要があると思われる。今まで間期に注目して  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度の上昇について検討した報告はなく、今回の結果は重要な所見であり、細胞周期研究にインパクトを与えることが示唆される。今後更なる細胞周期における細胞内カルシウム動態の調節機構を解明することは重要になるであろう。これら機能の解明は、今後癌治療を考える上でも貢献できると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

### 論文審査担当者

主査 教授 人見 次郎 (解剖学講座：人体発生学分野)

副査 教授 佐藤 洋一 (医学教育学講座)

副査 講師 木村 英二 (解剖学講座：人体発生学分野)

本研究は、細胞周期を容易に観察できる HeLa. S-Fucci2 細胞に  $\text{Ca}^{2+}$  指示薬を導入し、間期(G1)の細胞をレーザー顕微鏡下で確認しつつ、ATP 刺激により、それらの細胞の核および細胞質双方の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  変動を測定し、核と細胞質とにどのような違いがあるのか比較検討したものである。

細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  除去環境で、HeLa. S-Fucci2 細胞の核および細胞質ともに ATP は調べた因子のうちで最も強い  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇をもたらしたが、この上昇は核が先行する場合と同時に起こる場合が観察された。G1 の早期に細胞を同調させたところ、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇は核と細胞質で同時に生じ、P2Y および  $\text{IP}_3$  受容体の発現の違いが確認された。このことから、G1 期間に於ける P2Y と  $\text{IP}_3$  受容体の発現変動が ATP 応答の違いの原因であることが推察された。Fucci マウスの初代線維芽細胞にも、パターンは異なるが G1 期間の P2Y と  $\text{IP}_3$  受容体の発現変動が観察され、この現象が細胞腫を越えた事実である可能性が示唆された。

これまで間期である G1 期の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  濃度について個々の細胞で解析された報告は無く、また、G1 期間での P2Y と  $\text{IP}_3$  受容体の発現変動と  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  の上昇の変化が確認されたことも初めてであり、細胞周期の進行を考える上で大変興味深い。学位に値する研究であり、今後、更に細胞周期における  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  動態の調節機構の解明を期待する。

### 試験・試問の結果の要旨

研究の手法と結果の詳細を質問するとともに、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇機構および  $\text{Ca}^{2+}$  排泄機構、細胞周期に関する諮問を行い、適切な回答を得た。また、学位論文の作成にあたって、剽窃・盗作等の研究不正は無いことを確認した。

### 参考論文

- 1) Triple ectopic thyroid associated with normally located pretracheal thyroid gland: A rare entity (ガブリエル・ムコンデ, 他 2 名と共著) *Edorium Journal of Anatomy and Embryology* 3 号 34-38 (2016)
- 2) Different effect of serotonin on intracellular calcium ion dynamics in the smooth muscle cells between rat posterior ciliary artery and vorticosse vein (大久保 雅俊, 他 8 名と共著) *Biomedical Research* 37 号 101-105 (2016)
- 3) Unilateral variant in origin, position and course of pubic artery associated with a variant obturator artery and vein (ガブリエル・ムコンデ, 他 3 名と共著) *International journal of anatomy and research* 3 号 984-987 (2015)
- 4) ATP-Induced Nuclear and Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  Signal in Various Stages of Interphase HeLa/Fucci2 Cell (ガブリエル・ムコンデ, 他 2 名と共著) *International Journal of Sciences : Basic and Applied Research (IJSBAR)* 21 号 274-286 (2015)
- 5) Looped left testicular artery in relation to abnormal left renal vein: A case report (ガブリエル・ムコンデ, 他 3 名と共著) *International journal of Anatomical Variations* 7 号 57-59 (2014 年)