

(資料2)

h u m a n P 2 X 7 受 容 体 に お け る
環 境 ホ ル モ ン の 影 響

生 島 裕 恵

目 次

I 緒 言

II 実 験 方 法

II - 1 c D N A の 作 製 及 び 精 製

II - 2 R N A の 合 成 及 び 精 製

II - 3 R N A の イ ン ジ ェ ク シ ョ ン

II - 4 電 気 生 理 学 的 測 定

III 結 果

IV 考 察

V 謝 辞

VI 参 考 文 献

< 本文で使用した略字 >

ATP : adenosine 5'-triphosphate

dNTP : deoxynucleotide triphosphate

IAA : isoamyl alcohol

DTT : dithiothreitol

BSA : bovine serum albumin

UTP : uridine triphosphate

CTP : cytidine triphosphate

GTP : guanosine triphosphate

GpppG : diguanosine triphosphate

T7 : RNA polymerase

RNaseI : RNase inhibitor

Est:17 β -estradiol

I 緒言

近年，生体への環境ホルモンの影響が問題となっている．環境中には，生体内ホルモンである 17β -エストラジオールに類似した作用を持つ物質が数多く知られており，これらはヒトや動物へなんらかの影響をおよぼすとされている^{1) 2) 3)}．さらに，クローニングされた受容体を用いた実験において，ある種の受容体は環境ホルモン類によって影響を受けるという報告がある．例えば，ニコチン様アセチルコリン受容体である⁴⁾．受容体を構成するサブユニットによって異なるが，ニコチン様アセチルコリン受容体は 17β -エストラジオールや 17α -エチニルエストラジオールなどの化合物によって多くは抑制される．受容体は様々な薬物の作用点となり，生体内の反応及び薬理作用を引き起こす．このような環境ホルモンの受容体に対する作用は生体への影響を示唆するものであり，その性質を検討することにより環境ホルモンの

影響への対策が望まれる。この実験では、ATP受容体のサブクラスの一つである human P2X₇ (hP2X₇) へのエストロジオール類の影響を検討した。ATP受容体はアセチルコリン受容体と互いに影響する⁵⁾と言われており、このことからATP受容体へのエストロゲン類による影響を検討し、アセチルコリン受容体への影響と比較することは興味深いと考えられる。

ATPは生体内のエネルギー物質として有名であるが、ATP受容体は脳内にも多く発現しており、ATP分子が脳内の情報伝達を担うことも知られている。ATPレセプターはP2XとP2Yの二つに大別され、P2Xはイオンチャネル内蔵型であり、P2YはGタンパク共役型である。P2Xは非選択性のカチオンチャネルを形成し、シナプス伝達を担うとされている⁶⁾。現在、P2X受容体はP2X₁からP2X₇までの7種類のサブタイプが知られている⁷⁾⁸⁾。P2X₇は免疫系細

胞や肺，脾臓，ミクログリア，上位脳，せき髄などに発現している 6)。

実験は h P 2 X 7 をコードする c D N A から R N A を i n v i t r o 合成し，合成した R N A を注入し，受容体を発現させたアフリカツメガエルの卵母細胞の膜電流を，2本の微小電極を用い膜電位固定法によって測定した 9)。

充分な A T P 誘発電流を得るために，数種類の制限酵素を用いて，c D N A を様々な部位で切断したり，ベクターを組み換えるなどしてよりよい条件の R N A を作成することから始めた。最終的には p c D N A 3 というベクターを用い，タンパク質転写開始部位の前にある遺伝子配列を除いて，R N A 合成を行った。これはタンパク転写のときに，転写開始部位の前に余分な遺伝子配列が存在すると転写がうまく進まないことがあるために行った操作である。

Ⅱ 実験方法

Ⅱ - 1 c D N A の 作 製 及 び 精 製

① 大腸菌の形質転換を及びプラスミド溶出液の作製

【 試 薬 類 】

- ・ Competent cell: DH5 (東 洋 紡 績 株 式 会 社)
- ・ SOC solution (東 洋 紡 績 株 式 会 社)
- ・ Ampicillin sodium (和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社)
- ・ Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega)

-80℃で保存していたDH5を融解して、エッペンンドルフチューブに50 μ lを移し、hP2X7をコードするプラスミド約1 ngを加えた。これを氷中に30分間放置した（この間5～10分ごとに一回軽くはじいてよく混ざるようにした）。その後42℃のヒートショックを45秒間行い、氷中で2分程放置し室温に近くなってから、SOC solutionを450 μ lを加えた。Agarose plate [組成(1 L中) : Tryptone 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 5 g, Agar 15 g, Ampicillin

sodium 125 mg ;pH 7.5 with NaOH] に 1 倍 と 4 倍 の濃度の細胞懸濁液をそれぞれ $50\ \mu\text{l}$ ずつまいいて， $37\ ^\circ\text{C}$ で 12 時間培養した．

培養用の試験管に TB solution [組成 (1 L 中) : Tryptone 12 g, Yeast extract 9 g, glycerol 4 ml, KH_2PO_4 2.3 g, K_2HPO_4 12.4 g] 6 ml と Ampicillin sodium 液 ($1000 \times 125\ \mu\text{l}/\text{ml}$) $6\ \mu\text{l}$ を入れたものを 2 本準備し，培養後の Agarose plate からコロニーを 1 つずつひろい，各試験管に入れ， $37\ ^\circ\text{C}$ で振盪しながら 14 時間培養した．

増殖した大腸菌が溶液に均一となるようよく混ぜながら，約 $1600\ \mu\text{l}$ をエッペンドルフチューブに移し， $15000\ \text{rpm}$ ， $20\ ^\circ\text{C}$ で 2 分間遠心をし，上澄みを捨てた．この作業を 3 回繰り返して，大腸菌の塊を得た．そこに Cell Resuspension solution を $200\ \mu\text{l}$ ずつ加え，ピペティングで菌の塊を懸濁させた．Cell Lysis Solution を $200\ \mu\text{l}$ ずつ加え，15 回程上下に反転させるようにゆっくり振った後，Neutralization Solution を $200\ \mu\text{l}$ ずつ加え，ポ

ル テ ッ ク ス し た . こ れ を 15000 rpm, 20 ℃ で 5 分 間 遠 心 し た . 上 清 を 新 し い エ ッ ペ ン ド ル フ チ ュ ー ブ に 移 し , Resin を 900 μ l ず つ 加 え て , よ く ボ ル テ ッ ク ス し た . こ れ を カ ラ ム に 装 着 し た シ リ ン ジ に 流 し 込 み 吸 引 る 過 し , Colum Wash Solution 900 μ l で カ ラ ム を 2 回 洗 っ た . 洗 い 終 わ っ た カ ラ ム は エ ッ ペ ン ド ル フ チ ュ ー ブ に の せ , 15000 rpm で 1 分 間 遠 心 し て 吸 引 し き れ な か っ た 液 を 除 い た . 次 に 新 し い エ ッ ペ ン ド ル フ チ ュ ー ブ に カ ラ ム を の せ て , 蒸 留 水 50 μ l を 流 し 込 み , 1 分 間 放 置 し た 後 , 15000 rpm で 1 分 間 遠 心 し て , プ ラ ス ミ ド を カ ラ ム か ら 溶 出 さ せ た .

② プ ラ ス ミ ド の 大 き さ の 確 認

【 試 薬 類 】

・ 50×TAE Solution:Tris base

glacial acetic acid

EDTA

(す べ て 和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社)

・ Agarose gel:1×TAE solution

Agarose(和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社)

Ethidium Bromide

(ナ カ ラ イ テ ス ク 株 式 会 社)

・ 6×loading Dye (東 洋 紡 績 株 式 会 社)

・ λ Hind III (東 洋 紡 績 株 式 会 社)

プ ラ ス ミ ド 溶 出 液 8 μ l と 1×loading Dye 2 μ l
を ま ぜ て 泳 動 用 サ ン プ ル を 作 っ た . 50×TAE
solutionを8 mlと り , 蒸 留 水 を 加 え て 400 mlと
し , ゲ ル (1 % agarose) を セ ッ ト し た 泳 動 槽
に 流 し 込 ん だ . ゲ ル の wellに サ ン プ ル と λ hind
IIIを 10 μ lづ つ い れ , 20 分 ほ ど 泳 動 し た . 泳
動 終 了 後 , ゲ ル を 泳 動 槽 か ら は ず し , UV を
照 射 し , ポ ラ ロ イ ド カ メ ラ で 撮 影 し て プ ラ ス
ミ ド の 大 き さ を 確 認 し た .

③ プ ラ ス ミ ド の 不 要 な 部 分 の 除 去

【 試 薬 類 】

・ EcoRV (東 洋 紡 績 株 式 会 社)

・ Hind III (東 洋 紡 績 株 式 会 社)

・ M-buffer (東 洋 紡 績 株 式 会 社)

・ Klenow (東 洋 紡 績 株 式 会 社)

- ・ 10×dNTP (東 洋 紡 績 株 式 会 社)
- ・ 10×loading buffer (東 洋 紡 績 株 式 会 社)
- ・ エ タ ノ ー ル (和 光 純 薬 工 業 株 式 会 社)
- ・ 酢 酸 ナ ト リ ウ ム (片 山 科 学 工 業 株 式 会 社)

プ ラ ス ミ ド 溶 出 液 30 μ l を エ ッ ペ ン ド ル フ
チ ュ ー ブ に と り , M-buffer を 3.5 μ l, EcoRV 1
 μ l, Hind III 1 μ l を 加 え , ま ぜ て か ら , 37 $^{\circ}$ C で
反 応 さ せ た . 1 時 間 30 分 く ら い た っ た と こ ろ
で , 反 応 液 中 か ら 2 μ l 取 り 出 し , 1×loading
buffer 8 μ l を 加 え て ② と 同 様 の 手 順 で 泳 動 し ,
D N A の 制 限 酵 素 に よ る 切 断 を 確 認 し た . 確
認 後 , 反 応 液 に Klenow を 1 μ l, 10×dNTP を 3.4
 μ l 加 え て さ ら に 37 $^{\circ}$ C で 1 時 間 反 応 さ せ た .
Klenow 処 理 し た 反 応 液 を 22 μ l 取 り 出 し , 10×
loading buffer 2 μ l を 加 え て , Agarose gel 上 で 泳
動 し た . 20 分 程 泳 動 し た 後 , 弱 い U V を あ て ,
目 的 と す る 7 kbp の D N A 断 片 を 含 む ゲ ル を
切 り 出 し , 細 か く 刻 ん で , Quantum Prep
Freeze 'N Squeeze DNA GEL Extraction Spin
Column(BIO RAD) に 入 れ , -20 $^{\circ}$ C に 10 分 間 放 置 し

た．凍らせたゲルはカラムをつけたまま 15000 rpm, 室温で3分間遠心しDNAだけをカラムから溶出させた．このDNA溶液をエッペンドルフチューブに移し, エタノール 220 μ l と 3 M の酢酸ナトリウム溶液 10 μ l を加えて, ボルテックスし, -80 $^{\circ}$ C に20分間放置した．放置後, 15000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で10分間遠心し, DNAを沈澱させた．上清をピペットで吸い取った後, 70 %エタノール 200 μ l を加えて, 15000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で3分間遠心し, 上清を捨て, 99.5 %エタノール 200 μ l を加えて同じ操作をもう一度行った．溶液を捨てたら37 $^{\circ}$ C に30分くらい放置し, DNAを乾燥させ, 20 μ l の滅菌水に溶かした．

④ ライゲーション及び短縮したプラスミドの精製

【試薬類】

・ Ready-To-Go T4 DNA Ligase (アマシャム ファルマシア バイオテク(株))

Ready-To-Go T4 DNA Ligaseに, ③でゲルから切

り出し精製したDNA 20 μ lを静かに加え、5分放置した。ピペットでまぜ、スピンドウンし、16℃で、1時間反応させた。

ライゲーションを終えたものを2.5 μ lとり、50 μ lのDH 5に加え、①と同様の手順で形質転換を行った。コロニーより大腸菌を増殖させ、プラスミド溶出液を作成した。その後、②と同じように泳動し大きさを確認した。

⑤ 制限酵素によるプラスミドの直鎖化

【試薬類】

・ Xba I (東洋紡績株式会社)

・ M-buffer (東洋紡績株式会社)

プラスミド溶出液 20 μ l をエッペンドルフチューブにとり、M-buffer 2.3 μ l、Xba I 1 μ lを加えて、37℃で反応させた。1時間30分くらいたったところで、一度、②と同様の手順でゲル上で泳動し大きさを確かめた。DNAの制限酵素による切断を大きさで確認した後、反応を停止した。

⑥ 直鎖 DNA の精製

【試薬類】

- ・ TE飽和フェノール（和光純薬工業株式会社）
- ・ クロロホルム（和光純薬工業株式会社）
- ・ I A A（関東化学株式会社）
- ・ エタノール（和光純薬工業株式会社）
- ・ 酢酸ナトリウム（片山科学工業株式会社）

TE飽和フェノール：クロロホルム = 1 : 1 の溶液を用意した。制限酵素で切断した DNA 溶液に 80 μ l の滅菌水を加え、フェノール - クロロホルム溶液を 100 μ l 加えた。これをボルテックスした後、15000 rpm, 4℃で3分間遠心し、上の層を新しいエッペンドルフチューブに取り出した。次にクロロホルム：I A A = 1 : 1 の溶液を 100 μ l 加え、ボルテックスし、15000 rpm, 4℃で3分間遠心し、上の層を新しいエッペンドルフチューブに取り出した。ここにエタノール 220 μ l と 3 M の酢酸ナトリウム溶液 10 μ l を加えて、-80℃に20分間放置した。これを 15000 rpm, 4℃で

10分間遠心したあと，沈澱したDNAを取らないようにしながら，上清を捨てた．70%エタノール200 μ lを加えて，15000 rpm，4℃で3分間遠心し，溶液を捨て，99.5%エタノール200 μ lを加えて同じようにDNAを洗浄した．上清を捨てた後，37℃に30分くらい放置して，乾燥させ，20 μ lの滅菌水に溶かした．

II - 2 RNAの合成及び精製

【試薬類】

・T7 RNA Synthesis Set(株式会社ニッポンジーン)

エッペンドルフチューブにDNA 10 μ lをとり，氷上でDTT，BSA，ATP，UTP，CTP，1/10 GTP溶液をそれぞれ1 μ lずつ，10 mM GpppGを2 μ l，10×bufferを2.2 μ l加えた後，T7とRNase Iを1 μ lずつくわえた（T7とRNase Iは熱に不安定なので氷冷しておき最後に加えた）．軽くまぜた後スピンドウンし，37℃で2時間反応させた．

その後，Ⅱ - 1 ⑥ で D N A を精製するのと同様の手順で精製したが， -80°C 放置後は氷上で冷やしながらい， $10\ \mu\text{l}$ の滅菌水に溶かした。

Ⅱ - 3 R N A の イ ン ジ ェ ク シ ョ ン

① カエルの卵母細胞の採取及び調製

【試薬類】

・ コ ラ ゲ ナ ー ゼ (シ グ マ)

アフリカツメガエルを氷中に，1時間程置き冬眠状態にさせた。氷中で動かなくなったらアフリカツメガエルを，氷をしいた板の上に仰向けにし，下腹部を5 mmくらいハサミで切開し，ピンセットで卵母細胞を取り出した。取り出した卵母細胞はCa freeND96 [組成(1 L中) : NaCl 56 g, KCl 1.4 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g, HEPES 11.9 g ; pH 7.5 with NaOH] を入れたディッシュの中に入れた。カエルは卵母細胞を取り出したら，切開創を縫合し，室温で水中に3～4時間放置した。卵母細胞はディッシュの中でピンセッ

トを用いて軽くほぐし，15 mlのディスポーザブル試験管に移した後，2～3回 Ca^{2+} free ND96で洗った．ピペットで試験管内の溶液を除き，0.2% コラゲナーゼ溶液（ Ca^{2+} free ND96）を加えて60～90分程室温にて振盪した．照明装置（OLYMPUS ダブルアーム式）を点灯し，実体顕微鏡（OLYMPUS）下でコラゲナーゼ処理が充分であることを確認した後，ピペットでコラゲナーゼ溶液を除き， Ca^{2+} free ND96で2～3回洗浄し，コラゲナーゼ処理を終えた．卵母細胞をゲンタマイシン入りND96 [組成（1 L中）：NaCl 56 g, KCl 1.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.6 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2 g, HEPES 11.9 g ; pH 7.5 with NaOH]を入れたディッシュ（ファルコン 3002）に移し，1時間30分ほど放置した後，顕微鏡下で状態の良い卵を選んだ．

② インジェクション

【試薬類】

・流動パラフィン（和光純薬工業株式会社）
ガラス管（NICHIRYO 外径 1 mm，内径

0.5 mm, 長さ 90 mm) をプラー (成茂科学) で引き伸ばし, ガラス微小用研磨器 (成茂科学) で先端が 15 μ m 位になるよう粉碎して, ガラス微小ピペットを作った. このガラス微小ピペットを流動パラフィンで満たし, インジェクター (NICHIROYO) にセットした. 実体顕微鏡下に, パラフィルムを紙がついていた面を RNase free とみなしてその面を上にして置き, RNA 溶液を 2 μ l のせた. ガラス微小ピペットの先を RNA 溶液の中に入れ, RNA 溶液を吸い込んだ後, ガラス微小ピペットの先を引き上げ, パラフィルムを除いた. ゲンタマイシン入り ND96 を入れたインジェクション用ディッシュに, 卵母細胞を並べ顕微鏡下に置いた. インジェクターをマニピュレーター (成茂科学) で操作し, 卵母細胞に RNA 溶液を 40 nl ずつ注入した. 卵母細胞は ゲンタマイシン入り ND96 を入れたディッシュ (ファルコン 3001) に移し, 18 $^{\circ}$ C で 4~7 日間放置した.

II - 4 電気生理学的測定

【試薬類】

- ・ K C l (和光純薬工業株式会社)
- ・ A T P (シグマ)
- ・ 17β -estradiol (シグマ)
- ・ Bisphanol A (ナカライテスク株式会社)
- ・ 17α -ethynylestradiol (シグマ)
- ・ p-n-octhylphenol (和光純薬工業株式会社)
- ・ p-n-nonylphenol (ナカライテスク株式会社)

【器具類】

- ・ 微小電極用高入力抵抗増幅器
(MEZ-8300, 日本光電)
- ・ 電位固定用増幅器 (CEZ1200, 日本光電)
- ・ ペンレコーダー (日本電気三栄株式会社)
- ・ 電気刺激装置 (SEN-3301, 日本光電)
- ・ 電極作製機 (成茂科学)
- ・ 不関電極 : アガロースを 3 M K C l に溶解しガラス電極に流し込んだもの

芯入りガラス管 (成茂科学 GD-1.5) をプレーで引き伸ばし, 3 M K C l で満たして 2

本のガラス微小電極を作った。卵母細胞を動かないように灌流槽の窪みの部分に置いた。実体顕微鏡で観察しながら、マニピュレーターに固定した左右2本のガラス微小電極をできるだけ浅く刺入した。電位固定装置のスイッチを電位固定側に切り替えてクランプをスタートさせ、ND96で1.5~2 ml/秒の速さで灌流し、膜電流を安定させた。灌流液をATP含有のものに切り替え10秒間ATPで灌流し、膜電流の変化をペンレコーダー（日本電気三栄株式会社）に記録した。

ATPは30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM, 3 mMの濃度を用意し、濃度の低いものから90秒の間隔をおいて灌流しATP誘発電流のdose-response curveを求めた。

< エストロゲン類を用いての測定 >

エストロゲン類は1 μ M, 10 μ M, 100 μ Mと、1 μ M + ATP 1 mM, 10 μ M + ATP 1 mM, 100 μ M + ATP 1 mMの溶液を用意した。

卵の膜電流が安定した後、ATP 1 mMを10