

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Ion selectivities of the Ca^{2+} sensors for exocytosis in rat
phaeochromocytoma cells

和訳 ラット褐色種細胞におけるカルシウム依存性開口放出

機構のイオン選択性

指導教官 宮下保司 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成7年4月 入学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 岸本 拓哉

要旨

シナプス伝達は、神経終末から神経伝達物質が遊離することによって引き起こされる。神経伝達物質の遊離は、電位依存性カルシウムチャンネルからカルシウムイオンが流入することで、シナプス小胞あるいはシナプス前膜に存在するカルシウムセンサー蛋白質と結合し、伝達物質が蓄えられているシナプス小胞の膜がシナプス前膜との融合によって、小胞内の物質をシナプス間隙に放出する、開口放出によって行われると考えられている。このカルシウムセンサー蛋白質について、synaptotagmin を筆頭に多くの研究がなされているにも関わらず、決定的な分子機構が解明されるに至っていない。そこで、神経細胞と内分泌細胞の分泌小胞を併せ持つ、ラット褐色腫細胞(PC12 株化細胞)を用いて、その二種類の開口放出のイオン選択性を膜容量測定法とアンペロメトリー法によって解析した。カルシウムケイジド試薬にさまざまな二価金属イオンをキレートさせ、紫外閃光によりケイジド基を光解除することにより細胞内の金属イオン濃度を瞬時に、均等に上昇させた。その金属イオン濃度変化を高濃度でも測定できる金属結合定数の低い指示薬(BTC, BTC-5N)を用いて測定した。 Ca^{2+}

イオンのケージド解除により誘起された膜容量の増加は 30-100 ミリ秒と 10 秒の時定数を持った二相性を示した。large dence-core vesicle の開口放出を示すアンペロメトリーの反応は遅い相で選択的に起こり、細胞内カルシウム濃度が 0.1 mM 以上の上昇においても、早い相に移行することはなかった。開口放出の遅い成分は調べたすべての金属二価イオンで誘起された。50%有効濃度はそれぞれ、Cd²⁺イオン(18 pM), Mn²⁺イオン(500 nM), Co²⁺イオン(900 nM), Ca²⁺イオン(8 μM), Sr²⁺イオン(180 μM), Ba²⁺イオン(280 μM), Mg²⁺イオン(> 5 mM)であった。これに比較して、開口放出の早い成分は、Cd²⁺イオン(50%有効濃度、26 pM), Mn²⁺イオン(620 nM), Ca²⁺イオン(24 μM), Sr²⁺イオン(320 μM)で誘起することができたが、Ba²⁺イオン(>2 mM)と Co²⁺イオンはほとんど誘起することが出来ず、Mg²⁺イオンにおいてはまったく誘起出来なかった。また、早い成分の開口放出は、Na⁺イオン(50%有効濃度、44 mM)で競合的に阻害された、この効果は Li⁺, K⁺, Cs⁺ではみられなかった。さらに、遅い成分の開口放出でこの阻害効果はなかった。この Na⁺イオンによる阻害効果はイオン半径に起因しており 0.84 から 1.13 Å において見られた。

以上の結果から、large dence-core vesicle の開口放出におけるカルシウムセンサーのイオン選択性と 50%有効濃度が、生化学的に調べられた synaptotagmin-phospholipid のそれとよく一致したことから、この機構を介することをよく支持する。また、神経様小胞のシンクロナスな開口放出においては、そのカルシウムセンサーの特異なイオン選択性から、synaptotagmin 及び他の脂質や蛋白質の関与がありえることを示唆する。