

審査の結果の要旨

氏名 岸本 拓哉

本研究は、シナプス伝達や内分泌細胞の細胞機能を担うカルシウム依存性開口放出機構を探求する目的で、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と細胞内イオン濃度測定法によって解析を行い、下記の結果を得ている。

1. カルシウムケイジド試薬に金属イオンをキレートさせ、紫外光にてケイジド解除を行なわせることで、細胞内に放出されたのさまざまな二価金属イオン濃度と細胞の膜容量変化、カテコールアミンの分泌を同時に測定する方法を開発した。
2. Ca^{2+} イオンのケイ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 dense-core vesicles (LVs)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いことが明らかになり、この二相性の膜容量増加は異なる小胞の分泌であることが示唆された。
3. 開口放出の遅い成分は調べた Cd^{2+} イオン、 Mn^{2+} イオン、 Co^{2+} イオン、 Ca^{2+} イオン、 Sr^{2+} イオン、 Ba^{2+} イオン、 Mg^{2+} イオン、すべての二価金属イオンで誘起されることが明らかとなり、そのイオン選択性から LVsの分泌である事が示唆された。
4. これに比較して、開口放出の早い成分は、 Cd^{2+} イオン、 Mn^{2+} イオン、 Ca^{2+} イオン、 Sr^{2+} イオンで誘起されたが、 Ba^{2+} イオンと Co^{2+} イオンはほとんど誘起することが出来ず、 Mg^{2+} イオンにおいてはまったく誘起出来ないことが明らかになった。このようなイオン選択性から synaptic-like vesicles (SVs)の分泌である事が示唆された。

5. 早い成分の開口放出は、 Na^+ イオンで競合的に阻害されたが、この効果は Li^+ イオン、 K^+ イオン、 Cs^+ イオンではみられず、遅い成分の開口放出でこの阻害効果はないことが明らかになった。この Na^+ イオン阻害効果から、早い成分の開口放出機構のイオン選択性はイオン半径に起因していることが示唆された。
6. 遅い成分の開口放出の定量的なイオン選択性の特徴から、LVs の分泌におけるカルシウムイオン検知機構は、synaptotagmin-phospholipid の関与が示唆された。また、速い成分の開口放出の定性的なイオン選択性の特徴から、SVs の開口放出におけるカルシウムイオン検知機構は synaptotagmin 及び他の脂質や他の蛋白質の関与がありえることが示唆された。

以上、本研究は細胞内に直接さまざまな二価イオンを瞬時に与え、かつ細胞内イオン濃度を測定し、膜容量測定法とアンペロメトリー法を同時うことにより開口放出機構を定量化する実験系を確立した。従来、小胞の分泌機構は小胞や細胞の種類に寄らず統一的に考えられていた。それに対し、本研究は小胞の種類によって、分泌機構が異なる可能性を指摘し、従来解釈に一石を投じる形となった。また、従来、神経終末と内分泌細胞において知られていたイオン選択性の知見を系統的に初めて解析し、開口放出におけるカルシウムセンサーに対する重要な知見を与えるものであり、学位の授与に値するものと考えられる。