

論文審査の結果の要旨

氏名 中條浩一

本研究の目的は、筋肉細胞におけるイオンチャネル、受容体、イオン交換体などの発達過程と、それに伴った生理機能獲得のメカニズムを明らかにすることである。論文提出者は、発生のごく初期の段階から各割球の発生運命が決まっているマボヤを用い、電気生理学的手法と Ca^{2+} 感受性色素による細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を併せることによって、筋予定割球 B5.1 細胞の Ca^{2+} 動態および膜興奮性に関する膜分子の発達を解析した。

まず興奮収縮連関の最初のステップである電位依存性 Ca^{2+} チャネルについて、その電流の発達を 2 電極膜電位固定法によって測定した。マボヤ筋割球を水温 10 度の海水中で培養すると、受精後約 48 時間で孵化して泳ぎだすが、電位依存性 Ca^{2+} チャネルの電流は受精後約 20 時間より発現しだし、発生が進むにしたがって増大した。また L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルは Ca^{2+} によって不活性化するという性質をもつが、この不活性化の度合いを指標にすると、脱分極時の Ca^{2+} 流入による細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出が起こっているかどうかを判定できることを見出した。この方法を用いることで、 Ca^{2+} チャネルとリアノジン受容体の機能的な共役は受精の約 36 時間後に形成されることが明らかとなった。

マボヤ筋細胞の Ca^{2+} 放出の性質について、Oregon Green や fura-2 等の Ca^{2+} 感受性色素を用いてさらに解析をすすめ、マボヤ筋細胞の Ca^{2+} 放出は、哺乳類の心筋タイプと同様、外からの Ca^{2+} 流入に依存する Ca^{2+} 放出 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release; CICR) であることを明らかにした。また、この手法によっても Ca^{2+} チャネルとリアノジン受容体の機能的な共役が受精の約 34 時間後に起こることを示した。

次に短時間 (10 ms) の脱分極で誘発される細胞内 Ca^{2+} 上昇後の減衰の時定数を測定し、孵化後細胞膜直下での細胞内 Ca^{2+} 排除機構がさらに発達していることを示す結果を得た。 Ca^{2+} -ATP アーゼポンプの阻害剤である CPA を投与すると、減衰の時定数は著しく大きくなった。一方で細胞外の Na^{+} を Li^{+} に置き換えることに

より Na^+ - Ca^{2+} 交換体の役割についても検討したが、ほとんど影響が見られず Na^+ - Ca^{2+} 交換体の寄与は否定された。従って、膜直下での Ca^{2+} 濃度を減少させる役割は、主に筋小胞体 Ca^{2+} -ATPアーゼポンプが担っていると結論した。孵化したホヤの幼生が泳ぐ時の尾を振る速さも、孵化後徐々に速くなっていく現象が観察されたため、筋小胞体 Ca^{2+} -ATPアーゼポンプの発達が泳ぐ速さの発達に寄与している可能性を指摘した。

受精後 48 時間から 72 時間にかけて一過的な外向き電流が発達してくる現象が観察された。全細胞電流の解析とカフェインを用いた薬理的な実験により、この一過的な外向き電流がリアノジン受容体からの Ca^{2+} 放出によって活性化された Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルであることが示唆された。このチャンネルの性質と Ca^{2+} 放出との関係を調べるため、ホヤ筋細胞の Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルのシングルチャンネル電流の記録を試み、約 60pS のコンダクタンスを持つシングルチャンネル電流を得た。 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルと考えられるこのシングルチャンネル記録の解析とそのカフェイン感受性から、このチャンネルが CICR によって直接活性化されていることを示した。これにより Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネルとリアノジン受容体の位置関係が近いこと、この共役が筋細胞の脱分極（筋収縮）時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇と連動し細胞の膜興奮性に大きな影響を持っていることが示唆された。そして筋小胞体 Ca^{2+} -ATPアーゼポンプの発達と同様、受精後 48 時間以降このチャンネルが発達してくることが、細胞内 Ca^{2+} 放出のパターンを調節し、泳ぎの周波数の増加に寄与していることの可能性を指摘した。

以上を要約すると、論文提出者は、細胞の生理的機能の発達においてはイオンチャンネルやポンプなど関連分子の発現時期、発現量だけでなく、それら分子の機能的局在、あるいは機能的共役の発達が重要であることを示した。この点において細胞生理学上有意義な貢献をしたものと認められる。よって審査員一同、博士（学術）にふさわしい研究であると判断した。なお、本論文の内容の一部は 1999 年に *J. Physiology* 誌に公表されている。これは共著論文であるが、論文提出者はそのすべてにおいて研究の主要部分に寄与したものであることを確認した。