

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 鏝 本 義 治

本研究は hexamminecobalt(III) (HAC) chloride が膵島からのグルコース応答性インスリン分泌に対する強力な阻害作用を有することを見出し、その作用機序の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HAC は 22.2 mM グルコース刺激による単離マウス膵島からのインスリン分泌を濃度依存的に抑制し、その抑制率は 2 mM HAC 添加時で約 90%であった。さらに、perifusion 法により検討した結果から、2 mM HAC はグルコース応答性インスリン分泌の第一相を約 80%、第二相についてはほぼ完全に抑制することが明らかになった。ここで灌流液から HAC を除くと、直ちにインスリン分泌の回復が起こり、対照群を超える一過性の分泌ピークを示した後に対照群と同等のインスリン分泌量に回復して、HAC によるインスリン分泌阻害作用が可逆的であることが示された。
2. グルコース応答性インスリン分泌に対する阻害作用とは対照的に、HAC はインスリンの基礎分泌に対して有意な抑制作用を示さず、HAC の作用がグルコース等の刺激に応答したインスリン分泌経路に特異的であることが示唆された。
3. グルコース代謝による ATP 合成経路に対する HAC の作用を検討するため、グルコース刺激時の D-[6-<sup>14</sup>C]glucose 酸化亢進、細胞内 NAD(P)H 濃度上昇、ミトコンドリア内膜電位の過分極、及び細胞内 ATP 含量増加を測定した結果、HAC は ATP 合成経路に含まれるこ

これらの過程を阻害しないことが示された。

4. 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の変動に対する HAC の作用を検討するために、グルコース刺激時の細胞膜の活動電位、L 型  $\text{Ca}^{2+}$  チャネル経由の  $\text{Ca}^{2+}$  電流、細胞質  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇、及びミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇を測定した結果、HAC はこれらの過程に対して阻害作用を示さなかった。
5. グルコース応答性インスリン分泌経路の主要な要素に影響を与えない一方で、HAC は KCl を用いた脱分極刺激と、細胞外  $\text{Ca}^{2+}$  非存在下での mastoparan 刺激によるインスリン分泌に対しても共に阻害作用を示し、HAC のグルコース応答性インスリン分泌に対する阻害作用の作用点が細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の上昇より先の段階、おそらくは開口放出自体かまたは開口放出にごく近い段階に存在することが示唆された。
6. グルコース応答性インスリン分泌に伴う SNARE 複合体の形成・解離に対する HAC の作用を共免疫沈降法により検討した結果、HAC は非刺激時の SNARE 複合体の量には影響を与えず、グルコース刺激に伴う複合体の減少を阻害することが明らかになった。共免疫沈降法により検出される SNARE 複合体の増減は、細胞膜内面に結合した分泌顆粒の増減を反映しているため、HAC は分泌顆粒の細胞膜内面への結合を阻害せず、結合以降の開口放出過程、すなわち膜の融合及び SNARE 複合体の解離過程そのものか、または、膜の融合及び SNARE 複合体の解離の引き金となる過程に作用していると考えられた。

以上、本論文は hexamminecobalt(III) chloride がグルコース応答性インスリン分泌に対する強力な阻害作用を有することを見出し、その作用点が開口放出の過程にあることを明らかにした。インスリン分泌に対する hexamminecobalt(III) chloride の作用はこれまでに全く知られておらず、本研究の成果はインスリン分泌を初めとする開口放出機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。