

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目 **Fusion-pore mediated exocytosis and endocytosis of small vesicles**

和訳 融合細孔を介したシナプス様小胞の開口放出とエンドサイトーシス

指導教官 飯野正光 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月進学

医学博士課程

機能生物学専攻

氏名 劉 婷婷

### 要旨

神経伝達物質の放出は、脳の機能におけるもっとも重要な側面である。伝達物質が貯蔵された小胞の膜と細胞膜が融合することによって形成される融合細孔は、開口放出の中心的な役割を持つと考えられている。これまで、大型有髄小胞 (**Large dense-core vesicle**、**LV**) については、膜容量測定法とアンペロメトリー法など電気生理学的な手法により細孔の直径や性質を解析がなされているが、シナプス様小胞に至っては信頼に足りうる測定はなされていない。さらに、これらの方法によっては、細孔が閉じた後の小胞の運命に関する情報を追うことはできない。例えば、シナプス小胞のリサイクルに重要な役を果すと思われる **Kiss-and-run** エンドサイトーシスにおいて、融合細孔が形成され小胞が取り込まれた後の小胞の動態については、殆ど知見が得られていない。また、ニューロン以外の細胞においても、シナプス様小胞 (**small synaptic-like microvesicles**) が存在しており、これらの小胞がもつ機能についても未だ不明である。

そこで、われわれは、シナプス様小胞と **Large dense-core vesicle** を持つ PC12 細胞を用いて、開口放出前後の小胞の動態と融合細孔との関わりを、我々が開発した **TEPIQ** 法 (**two-photon excitation of extracellular polar tracers for imaging and quantitation**) と膜容量測定法と電子顕微鏡法によって解析を行なった。二光子励起顕微鏡を用いて細胞外に存在させた蛍光色素の独特な組み合わせによって行なう **TEPIQ** 法は、開口放出やエンドサイトーシスが盛んに起きる細胞間隙での観察に適し、分泌小胞の大きさや融合細孔の直径をナノメートル単位で計測することができる。我々はこの新しい測定法を用いて、PC12 細胞に存在する **Large dense-core vesicle** の直径を生きた細胞において **160nm** と計測し、**LV** が **compound** な開口放出を起こしていることを見出した。さらに、シナプス様小胞では **TEPIQ** 法により、直径 **1.6nm** 以下の融合細孔が一時的に形成されることによって細胞膜と融合することがわかり、膜容量測定法によって融合細孔は **2 s** 以内に閉じることが分かった。また、開口放出を起こした小胞とエンドサイトーシスによって取り込まれた小胞が共に直径 **50nm** の大きさであったことから、小胞が平滑化することなくエンドサイトーシスされていることが示された。加えて、この融合細孔を介したエンドサイトーシスは **GTPase** に非依存的であったことから、**Kiss-and-run** エンドサイトーシスと考えられた。このエンドサイトーシスされたシナプス様小胞は、細胞膜近傍に局在し、細胞内の深部のエンドソームやリソソームに取り込まれことを **TEPIQ** 法と電子顕微鏡法によって明らかにした。また、対照的に、**clathrin** コートを必要とする **constitutive endocytic vesicle** の直径は **80nm** であり、非加水分解性 **GTP- $\gamma$ -S** によってエンドサイトーシスは阻害された。

以上の結果から、PC12 細胞におけるシナプス様小胞のカルシウム依存性開口放出は、融合細孔が、その後のエンドサイトーシスを密接に制御していることが明らかとなった。また、我々が開発した **TEPIQ** 法は、生きた状態の細胞内における光学分解能以下の微小な小胞の動態や大きさ、融合細孔の大きさを測定できることから、細胞生物学分野において非常に有用な方法であると考えられる。