

## 審査の結果の要旨

氏名 劉 婷婷

本研究は、神経伝達や分泌細胞の細胞機能を担うカルシウム依存性開口放出前後の **small vesicle** の動態と **fusion pore** の性質を解明する目的で、シナプス様小胞と **Large dense-core vesicle** を持つ **PC12** 細胞を用いて、膜容量測定法、二光子励起顕微鏡法と電子顕微鏡法によって解析を行い、下記の結果を得ている。

1. 脂質膜に特異的に染色する蛍光色素 **FM1-43** を用い、膜容量測定法と同時測定によってカルシウム依存性開口放出を解析した結果、異なる小胞の開口放出と細胞内への回収による二相性の **exocytosis** と **endocytosis** が明らかになった。放出されたシナプス様小胞 **small vesicle** は素早くほぼ全量に回収され、**fusion pore** が 2 秒以内に閉じたことが示唆された。**FM1-43** を用いた蛍光測定法は、膜容量測定法と遜色しない高い時間分解能があり、組み合わせて用いることで **endocytosis** と **exocytosis** を分離して定量することができた。
2. 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** 法を開発した。**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、空間分解能以下にもかかわらず、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できる方法である。この新しい **TEPIQ** ( $\Delta V$ -**TEPIQ**、 $\Delta S$ -**TEPIQ**、 $\Delta V / \Delta S$  -**TEPIQ**) 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約 **160nm** と計測し、**LV** が **sequential compound** な開口放出を起こしていることを見出した。
3. さらに、シナプス様小胞では、 $\Delta V / \Delta S$ -**TEPIQ** 法により、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。また、異なる分子サイズを持つ蛍光色素を用いて調べた結果、シナプス様小胞が直径 1.6nm 以下の融合細孔を一時的に形成することによって細胞膜と融合することが分かった。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。

4. 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された。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、新たに開発された **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。また、**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。これらの結果は、神経終末と分泌細胞における開口放出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。