

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 木 村 良 一

本研究では、小胞が原形質膜へ移動し、形態的に原形質膜とドッキングし、融合能力を獲得し、原形質膜と融合すると考えられている小胞の開口放出の機構を明らかにするため、電気生理学的研究、電子顕微鏡による研究においてスタンダードなモデルである哺乳類（牛、豚）の副腎髄質クロマフィン細胞の開口放出を、二光子励起顕微鏡を用いて可視化した。その結果、下記の結果を得ている。

1. 細胞間の組織構造を保った状態の複数の細胞からなるクラスター試料を採用し、灌流液に水溶性トレーサーとして 0.5 mM の SRB (sulforhodamine B) を加えて細胞間隙を可視化した。開口放出が起こると細胞外液が融合細孔を通して小胞内に急速に入るので、その小胞を蛍光の輝点として示すことができる。副腎髄質細胞を 70mM カリウム溶液で脱分極刺激し、開口放出して 0.2 s 以内に原形質膜と平滑化する様式（フル・フュージョン型）、細胞質のより深い部分まで顆粒が逐次的に開口放出を起こし膜融合後、大きく膨張して内腔を形成する様式（空砲型）、開口放出後に細胞内の再び取り込まれる様式（キス&ラン型）の三種類の開口放出を確認した。
2. 特徴的な空砲型の開口放出を詳細に解析するために、ケージド Ca^{2+} 化合物、NPE の光分解により細胞質内の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) を急激に、かつ均一に増加させる方法でも開口放出を観察した。どちらの場合も単位面積あたりの開口放出の出現率において、もともとの原形質膜上よりも内腔上のほうが高かった。よって、内腔の形成は開口放出の効率の上昇につながることを示唆された。
3. 内腔形成の機構を調べるために SRB とともにフィコール(14%, Ficoll) を加えてコロイド浸透圧を変化させた。その結果、ケージド Ca^{2+} 化合物により十分なカルシウム上昇が与えられていても、逐次開口放出が起こったが開口放出に伴う内腔様構造の膨張が強く阻害された。つまり、内腔様構造の膨張は膜融合細孔と狭い細胞間隙によって内腔内に閉じ込められたヒドロゲ

ル 《水を分散媒とするゲル》の膨張に起因すると考えられる。

4. 小胞内のゲルが内腔様開口放出においてどのくらいの空間的な制約を受けるのか、それが開口放出にどのように影響するかを調べるために、2 mM の大きさの違う蛍光デキストラン (Fluorescein dextrans :FD, 10, 70 or 500 kDa) と SRB の同時多重染色イメージングを行った。10, 70, 500 kDa デキストランの直径は、はそれぞれ 6, 12, 20 nm とした。その結果、内腔の膜融合細孔の直径と組織構造を保った副腎髄質の細胞間隙が 12 nm から 20 nm の間に制御されていることがわかった。

5. 小胞の開口放出の準備性についても検討した。抗体免疫染色法を用いて膜融合に必要とされる SNAP24 の局在を調べると、コントロールでは原形質膜にしか存在しないが、刺激後は内腔の膜に拡散しているのがわかった。また、SNAP24 に蛍光タグ (ECFP) をつけて SRB と同時多重染色イメージングを行い、同じ結果を得た。よって小胞同士の膜融合が開口放出の前に起こる複合型開口放出ではなく、逐次開口放出であることが示唆された。このことから、小胞の膜融合準備状態は、原形質膜近傍の小胞と内腔様構造が到達した細胞深部における小胞との間に差はないと考えられる。

以上、本論文は、より組織構造を保った副腎髄質において開口放出を可視化することにより、初めてその様式が明らかになり、小胞内のゲルが膜融合前の制御に働いて開口放出を促進していることを見出した。また、最外層の小胞もさらに深い細胞質層にある小胞も膜融合準備状態に差はないことも示すことができた。今回、新たに報告した空胞型逐次開口放出は、活発な小胞内基質ゲル、融合細孔の正確な制御、そして組織構造を保った副腎髄質の狭い細胞間隙を有効に使った、全く新しい機構であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。