



Title	ラット大脳皮質より分離したSynaptic MembraneとCa++との結合について
Author(s)	斎藤, 喜八
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/30631">https://hdl.handle.net/11094/30631</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

[7]

氏名・(本籍)	齋藤喜八
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 2495 号
学位授与の日付	昭和47年3月25日
学位授与の要件	医学研究科生理系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ラット大脳皮質より分離した Synaptic Membrane と Ca <sup>++</sup> との結合について
論文審査委員	(主査) 教授 吉田 博 (副査) 教授 清水 信夫 教授 山野 俊雄

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

神経終末では興奮に伴って細胞外Ca<sup>++</sup>の流入、および膜結合Caの遊離により細胞内Ca<sup>++</sup>濃度の上昇がみられる。その回復過程としてCaのPump-Out、あるいは膜との結合がおこると考えられる。そこでラット大脳皮質より分離したSynaptic Membrane(神経終末膜)を用いてCa<sup>++</sup>の動きについて調べ、神経細胞の興奮現象、あるいはその回復現象との関連を知ろうとした。

[方 法]

Whittakerらの方法を多少modifyして調製したSynaptic Membraneを用いて主にCa<sup>++</sup>-Stimulated ATPase活性、およびCa<sup>++</sup>結合について調べた。Ca<sup>++</sup>結合は遠心分離法により行い、Caの測定は原子吸光、あるいは<sup>45</sup>Caを用いて行った。

[結 果]

- (1) Whittakerらの方法により調製したSynaptic MembraneにはNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>Activated ATPase活性、およびCa<sup>++</sup>-Stimulated ATPase活性が高く分布し、このCa<sup>++</sup>-Stimulated ATPase活性は10<sup>-4</sup>M MEGTA存在下で9×10<sup>-5</sup> M CaCl<sub>2</sub>で最高の活性を示す。
- (2) このSynaptic Membraneを用いてCa<sup>++</sup>-Stimulated ATPase活性発現の至適条件下でCa<sup>++</sup>結合を調べた。0℃では9×10<sup>-5</sup>M CaCl<sub>2</sub>、あるいはCaCl<sub>2</sub>と2 mM ATPを添加してもMembraneのCa量には変動はないが、37℃ではCaCl<sub>2</sub>とATPの添加により、約10mμmoles / mg蛋白のCaが増加している。したがってSynaptic MembraneにはATP依存性の、しかも温度依存性のCa<sup>++</sup>結合が存在する。
- (3) Synaptic MembraneのCa<sup>++</sup>結合は骨格筋のSarcoplasmic ReticulumのようにOxalate (10<sup>-3</sup>M)による促進もみられなく、その他Protoveratrin (10<sup>-4</sup>M)、Ouabain (10<sup>-4</sup>M)、Salyrgan (5×

$10^{-5}\text{M}$ ) などの影響を受けない。Oligomycin ( $2.5\text{r}/\text{ml}$ ) により30%の阻害を受ける。

- (4) この $\text{Ca}^{++}$ 結合はATPにSpecificであり、ADPがわずかに有効であるがその他のNucleotideでは作用がみられなく。
- (5) 1～2分でほとんど最高に達し、それ以上の結合はみられない。
- (6) 同じ条件下でMicrosome分画の $\text{Ca}^{++}$ 結合は $2\sim 3\text{m}\mu\text{ moles}/\text{mg}$ 蛋白である。Intrasynaptosomal Mitochondria分画 (ISM) でもSynaptic Membraneの2倍の $\text{Ca}^{++}$ 結合を示すが最高に達するのに5～10分を要する。
- (7) ATP存在下の $\text{Ca}^{++}$ 結合からATPが存在しない場合の $\text{Ca}^{++}$ 結合を差引いた値をATP-Dependent  $\text{Ca}^{++}$ 結合とすると $\text{Ca}^{++}$ Stimulated ATPase活性の場合と同じく $10^{-4}\text{MEGTA}$ 存在下で $9\times 10^{-5}\text{M}-\text{CaCl}_2$ で最高の結合を示す。さらにくわしくfree calcium ion濃度 [ $\text{Ca}^{++}$ ] との関連を調べるためにcalcium EGTA bufferを用いて [ $\text{Ca}^{++}$ ] をadjustして $\text{Ca}^{++}$ 結合を調べたところSynaptic Membraneの $\text{Ca}^{++}$ 結合は $3.3\times 10^{-7}\text{M}$  [ $\text{Ca}^{++}$ ] で最高であるのに対してMicrosome分画は $8\times 10^{-7}\text{M}$  [ $\text{Ca}^{++}$ ] で最高の結合を示し、ISM分画の $\text{Ca}^{++}$ 結合は [ $\text{Ca}^{++}$ ] に比例して多くなる。
- (8) Synaptic MembraneにPreloadした $^{45}\text{Ca}$ はATP存在下でretainされるがCaffeine (1 mM, 5 mM) により遊離してくる。Microsome分画、あるいはISMにPreloadした $^{45}\text{Ca}$ はCaffeineにより遊離してこない。

したがってこれらのことより Synaptic Membrane の $\text{Ca}^{++}$ 結合はMicrosome分画、あるいはISMのそれとは異なった Specificなものであることが明らかになった。

#### [総括]

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ の動きが大きい興奮膜に $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -Activated ATPase活性が高いことを考えれば神経膜で $\text{Ca}^{++}$ -Stimulated ATPase活性が高いことは $\text{Ca}^{++}$ の動きとの関連が考えられる。従来神経末端ではMicrosome分画が $\text{Ca}^{++}$ のregulationに重要であるという説と、Mitochondriaによるregulationが重要であるという説があり、Synaptic Membraneの重要性については考えられていなかった。これに対してここに得られた結果ではSynaptic Membraneにも $\text{Ca}^{++}$ 結合がみられ、Microsome分画、あるいはISMよりも低濃度の $\text{Ca}^{++}$ に対して Sensitiveであることより Synaptic Membrane も神経末端での $\text{Ca}^{++}$ のregulationに重要な役割を果しているのではないかと考える。他の可能性としてこの結合はCa-pumpの部分反応かもしれない。

また Caffeine により Synaptic Membrane に Preload した $^{45}\text{Ca}$ だけが release してくるという点も Caffeine が中枢神経興奮薬であることより興味がある。

### 論文の審査結果の要旨

神経膜を通しての $\text{Ca}^{++}$ の動きが神経伝達と密接な関係があることが明らかになってきた。しかし神経膜の分離の煩雑さから生化学的な研究は少ない。従来脳において遊離Caイオン濃度 [ $\text{Ca}^{++}$ ] を調

節するのはMicrosome分画であるという結果、あるいはMitochondria分画であるという結果が報告されているが、直接神経膜でのCa<sup>+</sup>の動きについて調べた報告はない。

本研究では神経膜のLarge Scaleでの調製法を開発し、しかもこの神経膜を用いて直接Ca<sup>+</sup>の動きについて調べた。

その結果神経膜に特異的なCa<sup>+</sup>結合を見出し、従来のMicrosome分画、あるいはMitochondria分画による[Ca<sup>+</sup>]の調節よりもさらに低濃度の[Ca<sup>+</sup>]での調節機構が神経膜に存在することが明確になった。

本研究で明らかになった神経膜に特異的なCa<sup>+</sup>結合は今後の神経膜機能の研究の基礎となり、神経伝達機構の解明に大いに貢献することは明白である。