

Title	シナップス形質膜とCaとの結合について
Author(s)	市田, 成二
Citation	大阪大学, 1977, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/31575">https://hdl.handle.net/11094/31575</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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【 2 】

氏名・(本籍)	いち 市	だ 田	せい 成	じ 二
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	3872	号	
学位授与の日付	昭和52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	シナプス形質膜とCa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	和田	博	教授 垣内 史郎

論 文 内 容 の 要 旨

183

[目 的]

神経活動の様々なレベルにおいてCaイオン (以下Ca<sup>++</sup>) は非常に重要な役割を演じているという報告が数多く提出されている。

そこで、神経終末の原形質膜におけるCa<sup>++</sup>の動態を観察する事は静止時および興奮時の神経活動状態を理解する上で非常に意義ある事と考え、シナプス形質膜分画におけるCa結合の性質について検討した。

[方 法]

WHITTAKERらの方法に準じて、ラット脳より分画遠心にて神経終末分画を得、更にシナプス形質膜分画を調製した。このシナプス形質膜分画を用いて、ATP-依存性Ca結合およびMg.Ca-ATPase活性を測定した。

ATP-依存性Ca結合：標準反応メディウムとしてTris-HCl(pH 7.4)50mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 9 x 10<sup>-5</sup>M, EGTA 0.1mM, ATP 2 mMおよび<sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> (約 0.2μCi) を使用し、通常2分間37°Cで反応後、Milipore filter法によりCa結合量を測定した。

Mg.Ca-ATPase活性：標準反応メディウムはATP-依存性Ca結合の場合と同じである。但し<sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> は含まれない。通常30分間37°Cで反応後、遊離したPi量の測定はTAKAHASHI法に従って行った。Mg.Ca-ATPase活性とは、この様にして得た活性値から標準反応メディウム中のCaCl<sub>2</sub>を除いた場合に得られるMg.ATPase活性値を引いた値を意味する。

[成 績]

(1) シナップス形質膜におけるCa結合はATPに依存しておりATPに関するKm値は約 $2.7 \times 10^{-5}$  Mであった。しかもATPに特異的で他のnucleotides類およびp-nitrophenyl phosphate, carbamyl phosphate およびacetyl phosphate の効果は認められなかった。

(2) MgイオンによってCa結合量は増大し、 $Mg^{++}$ の至適濃度は2mMであった。

(3) 非放射性Caを2分間37°Cでとり込ませsteady stateになった所で、微量の $^{45}CaCl_2$ (約 $5 \times 10^{-10}$  moles)を添加し、形質膜への $^{45}Ca$ のラベリングを時間的にみると非常に速やかに起り、この時の2分後の値は反応の初めから $^{45}CaCl_2$ を存在させた場合より僅かに低くなった。このことはsteady stateにおいてもシナップス形質膜に結合しているCaの大部分がメディウム中の遊離Caと極めて活発に交換している事を示唆している。

(4) このCa結合は一価のカチオン、特にNaイオン (以下 $Na^+$ ) およびKイオン (以下 $K^+$ ) により特異的な影響を受けた。即ちKCl又はRbCl 100mM存在下ではCa結合量は増大し、NaCl又はLiCl 100 mMによって著明に抑制された。この $Na^+$ による抑制効果はKClの存在下でより一層著明となりCa結合量を半分にする $Na^+$ 濃度は約15mMであった。

(5) この $Na^+$ 効果は非常に速やかで、ATP存在下結合Caがsteady stateになった所でNaCl 100mMを添加すると、10秒以内にほとんどの膜結合Caが遊離された。

(6) Mg.Ca-ATPase活性とATP-依存性Ca結合に関して次の様な結果を得た。(a) NaCl 100mM, cysteine 5 mMによってATP-依存性Ca結合は著明に抑制されたが、Mg.Ca-ATPase活性は有意に影響を受けなかった。(b),  $La^{+++}$ ,  $Mn^{++}$  およびRuthenium redによってMg.Ca-ATPase 活性が特異的に抑制される濃度( $La^{+++}$ ,  $Mn^{++}$  およびRuthenium redに対する $K_i$ 値は、それぞれ 0.05 mM, 0.06 mM および 0.03 mMである)で、ATP-依存性Ca結合は抑制されなかった。(c)シナップ形質膜をKCl 1 M+DOC (0.4mg/mg蛋白) で20分間0°C処理した場合、その遠心沈 におけるATP-依存性Ca結合量は、未処理のシナップス形質膜に比べて蛋白当りの比活性は $18.0 \pm 4.5\%$ に低下していたが、一方Mg.Ca-ATPase活性は $210.8 \pm 25.0\%$ と約2倍に増大しており両者間の解離が認められた。これらの結果よりシナップス形質膜におけるATP-依存性Ca結合とMg.Ca-ATPase活性とは直接関係していないと思われる。

#### [総括]

シナップ形質膜におけるCa結合はATPに依存し、しかも遊離 $Ca^{++}$ の至適濃度が約 $3 \times 10^{-7}$  Mと非常に低濃度である所から、神経細胞終末の形質膜の内表面でこのCa結合が生じていると考えられる。

更に、このCa結合に対する一価カチオンの効果は特異的で $Na^+$ と $K^+$ では相反する効果を有していた。このことから、神経終末内の $Ca^{++}$ 濃度は一部このCa結合に対する一価カチオンの特異的な効果によって調節されていると考えられ、ATP-依存性Ca結合は特別なCa-poolとしてこの働きを行っている可能性を有していると思われる。ATP-依存性Ca結合はATPに対し特異的であり、又Mg.Ca-ATPase活性とは直接関係がないという結果が得られた所から、筋小胞体におけるCaとり込み機構とは性質が異なるとと思われる。

この様にシナップス形質膜におけるATP-依存性Ca結合は、神経終末における $Ca^{++}$ の動態に関して

重要な意義を有していると考えられる。

### 論文の審査結果の要旨

神経細胞終末に興奮が伝えられると、終末の $\text{Ca}^{++}$ 濃度が上昇し、この $\text{Ca}^{++}$ が神経刺激伝達物質を放出させることはよく知られている。しかし、種々の細胞内Ca-プールからの $\text{Ca}^{++}$ の動員および神経伝達に寄与した後の $\text{Ca}^{++}$ の動態に関しては明らかにされていない。

本研究ではシナプス形質膜における $\text{Ca}^{++}$ 結合の性質を検討し、次のような新しい知見を得た。

この結合は温度とともにATPに特異的に依存するが、シナプス形質膜にみられるMg,Ca-ATPase活性とは直接関係がない。またシナプス形質膜のCa-結合量は一価のカチオンにより特異的な影響を受ける。即ち、 $\text{K}^{+}$ によりCa結合量はやや増加の傾向を示すが、 $\text{Na}^{+}$  100mMにより結合Caの大部分が10秒以内に遊離した。

本研究は神経終末内の $\text{Ca}^{++}$ の動態についての理解を深め、神経伝達機構の解明に貢献するもので、学位論文に十分値するものとする。