



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Exocytosisとクロマフィン顆粒                                                                                                                             |
| Author(s)    | 宮下, 孟士                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1978, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/31903">https://hdl.handle.net/11094/31903</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">大阪大学の博士論文について</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

|             |                              |
|-------------|------------------------------|
| 氏 名・(本籍)    | 宮 下 孟 士                      |
| 学 位 の 種 類   | 医 学 博 士                      |
| 学 位 記 番 号   | 第 4 1 9 4 号                  |
| 学位授与の日付     | 昭 和 53 年 3 月 18 日            |
| 学位授与の要件     | 学位規則第 5 条第 2 項該当             |
| 学 位 論 文 題 目 | <b>Exocytosis と クロマフィン顆粒</b> |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査)<br>教 授 西 川 光 夫          |
|             | (副査)<br>教 授 吉 田 博 教 授 和 田 博  |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔目 的〕

ホルモンの分泌過程に於ける  $\text{Ca}^{2+}$  の重要性は一般的なものである。副腎髄質細胞の場合、アセチルコリンにより細胞が刺激された際、細胞内への  $\text{Ca}^{2+}$  influx が起こりカテコールアミン (CA) が分泌される。しかし細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の作用機序に関しては詳細な報告がない。そこで細胞内での  $\text{Ca}^{2+}$  の作用を検討する目的で、ウシ副腎髄質より分離したクロマフィン顆粒を用い、より単純化した系での実験を行なった。他方髄質細胞からの CA 分泌は形態学的には exocytosis の機構が提唱されている。従って分離した顆粒で得られる知見が exocytosis をどの程度反映しているかという検討が必要となる。そこで顆粒を用いる実験系に髄質細胞の細胞質成分、細胞膜成分を添加し、細胞の再構成を試み、分泌過程に於ける  $\text{Ca}^{2+}$  の関与を一連の流れとして把握することを試みた。更にクロマフィン顆粒が分泌顆粒として働く背景にはどのようなものがあるか、また exocytosis の最終過程である細胞膜と顆粒膜の融合がどのようにして起こるのか等について検討した。

### 〔方法ならびに成績〕

#### I 方 法

実験にはウシ副腎髄質を使用し、顆粒はミリポアフィルターで分離した。細胞質ならびにマイクロゾーム分画は超遠沈により調製した。細胞質については硫酸分画後透析し実験に供した。

CA の定量はエチレンジアミン縮合法、非放射性イオンの測定は原子吸光法、その他の定量は常法に従った。

#### II 成 績

- 1) 顆粒からのCA遊離と顆粒への $\text{Ca}^{2+}$ 結合は $\text{ATP-Mg}^{2+}$ に依存性であった。また $\text{Cl}^-$ 等のアニオンの存在を必要とした。
- 2)  $\text{ATP-Mg}^{2+}$ による顆粒への $\text{Ca}^{2+}$ 結合は非可逆的なものではなく、溶液中のフリーの $\text{Ca}^{2+}$ と急速なexchangeを示した。 $\text{Ca}^{2+}$ の結合と顆粒からのCA遊離の間には平行関係が認められた。
- 3) 顆粒からのCA遊離は、細胞質蛋白、細胞膜蛋白などの添加により促進された。これら蛋白成分は一定条件下では顆粒のlysisを起こすことが明らかになった。
- 4) 顆粒への $\text{Ca}^{2+}$ 結合をキニジンなどで阻害しておくと、これら顆粒からのCA遊離は起こらなかった。
- 5) 顆粒内は細胞質に比して $\text{Na}^+$ が高濃度に保たれており、 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ のモル比は細胞質中に比し約3倍であった。
- 6) 顆粒膜と細胞膜の類似性を検討する目的で顆粒膜のシアル酸含量および細胞膜のmarker enzymeの存在につき検討したところ、顆粒膜にはシアル酸が多量に含有されていた。このシアル酸は主として顆粒膜内側に存在していた。また検討した範囲内では細胞膜marker enzyme活性は全て顆粒膜にも認められた。

〔総 括〕

- 1) クロマフィン顆粒は $\text{Ca}^{2+}$ のreceptive siteとして働き、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合した状態で細胞質蛋白等の作用を受けlysisを起こすものと考えられる。 $\text{Ca}^{2+}$ 結合はCA遊離のための前提必要条件である。
- 2) イオン組成、シアル酸の分析から、クロマフィン顆粒の顆粒膜は細胞膜に比しinside outである可能性が示唆される。また両膜系は共通の構成成分を持っており、これらの点が顆粒膜と細胞膜が融合する上で有利な条件を提出するものであると思われる。
- 3) 分離顆粒系を用いた実験がexocytosisの機構を解明する上で極めて有効な手段であることが明らかになった。

## 論文の審査結果の要旨

カテコールアミン (CA) 分泌には $\text{Ca}^{2+}$ が必要であることがよく知られている。本論文はクロマフィン顆粒が $\text{Ca}^{2+}$ のreceptive siteとして働き、 $\text{Ca}^{2+}$ の結合した状態で細胞膜蛋白等の作用を受け、顆粒がlysisを起こしCAを遊離させることを示した。更に顆粒内は細胞質中に比し高 $\text{Na}^+$ に保たれていること、また顆粒膜内側にシアル酸が存在することより、顆粒膜が細胞膜に比しinside outであることが示唆されたものである。これらのことはexocytosisの機構とそこに於ける $\text{Ca}^{2+}$ の役割を解明する上で極めて興味深い知見であると思われる。