Osaka University Knowledge Archive

Title	神経細胞におけるCa2+動態とイノシトールリン脂質の代謝回転との関係
Author(s)	大杉, 武
Citation	大阪大学, 1985, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/34667
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏名・（本籍）	大杉　武（おおすぎ　たけし）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第　6803　号
学位授与の日付	昭和60年3月25日
学位授与の要件	医学研究科　生理系専攻 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	**神経細胞における Ca^{2+} 動態とイノシトールリン脂質の代謝回転との関係**
論文審査委員	（主査） 教授　吉田　博 （副査） 教授　和田　博　教授　中川　八郎

論文内容の要旨

（目　的）

細胞膜のある種の受容体刺激により，細胞内 Ca^{2+} 濃度（〔Ca〕i）が上昇し，この〔Ca〕i 上昇は細胞外からの Ca^{2+} 流入や細胞内 Ca^{2+} プール（ER，ミトコンドリアなど）からの Ca^{2+} 遊離により増加すると考えられている。また，同時にホスファチジルイノシトール（PI）の代謝回転が促進すること（PI response）が知られており，最近 Ca^{2+} 動態と PI response の関係が注目されている。本研究は，受容体活性化による Ca^{2+} 動態変動の機構を明らかにするために，Ca^{2+} 感受性蛍光プローブ Quin 2 を用いて Ca^{2+} 動態に対するイノシトールリン脂質の代謝産物の作用について検討を行なった。

（方　法）

1. 細胞培養

実験に用いた細胞はニューロブラストーマ×グリオーマのハイブリッド細胞（NG 108-15）で，ダルベッコ MEM（10% FCS と HAT 培地を含む）培地を用いて CO_2 インキュベータで培養を行なった。

2. 〔Ca〕i の測定

細胞を30～50 μM Quin 2 AMを含むバッファーで60分間，37°Cでプレインキュベートした後，残っている Quin 2 AM を洗浄して取り除き，細胞を再びバッファーに懸濁した。この細胞を蛍光セルに入れて，常時撹拌し蛍光光度計（日立 MPF-4）にて測定した。〔Ca〕i は Tsien らの方法に従って求めた。

3. 細胞内注入法

薬物の細胞内での作用を調べるために，単一細胞内の Quin 2 の蛍光を顕微鏡下に測定しながら，ガラ

スピペット（2M KCl を入れた場合30～50MΩ）を用いて薬物を細胞内へ電気泳動的に注入した。

4. イノシトール－1－リン酸(IP1),イノシトール－2－リン酸(IP2)，イノシトール－3－リン酸（IP3)の精製

Dawson 法に従い，クロロホルム・メタノール・HCl を用いて牛脳の抽出液からホスファチジルイノシトール4，5－ビスホスフェイト（PIPP）を精製した。このPIPPを加水分解してIP1,IP2,IP3を得た。次にStrebらの方法に従い，Dowex AG－1X8 formate column を用いて，IP1,IP2,IP3 を分離，精製した。また，高電圧ろ紙電気泳動法（ピリジン・酢酸バッファーpH 3.4 ）を用いてIP1, IP2，IP3の純度を調べた。

（結果及び考察）

1. ブラジキニン，high Kによる〔Ca〕i 上昇の性質

Quin 2を含む細胞をブラジキニン（10nM）で刺激すると〔Ca〕i は15秒以内に100nMから 250nMに上昇し，3分以内にもとの状態にもどった。〔Ca〕i はブラジキニンの濃度に依存して増加し，10nMのブラジキニンでほぼ最高値に達した。同様にhigh K（40nM)に依っても230nMまで〔Ca〕iは上昇した。次にこれらの〔Ca〕i 上昇が細胞外 Ca^{2+} 濃度（〔Ca〕o）に依存するかどうか調べた。high K による〔Ca〕i 上昇は〔Ca〕o を10μMに下げると完全に抑えられたが，ブラジキニンによる〔Ca〕i 上昇は〔Ca〕o を10^{-6} M以下にしないと抑制されなかった。電位依存性 Ca チャンネルの拮抗薬であるベラパミール（50μM），ニフェジピン（1 μM）により，high K による〔Ca〕i上昇は阻害されたが，ブラジキニンによる作用は抑制されなかった。従ってhigh Kによる〔Ca〕i 上昇は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを介する Ca^{2+} 流入により生じ，ブラジキニンによる〔Ca〕i上昇は，別の機構を介する反応であると思われる。

次にブラジキニンによる〔Ca〕i 上昇を生じる機構として，Ca^{2+}／Na^{+} antiport，Ca^{2+}／H^{+} antiport，Ca^{2+}／OH^{-} symport の関与について検討した。低Na バッファー（140mM NaClの代わりに140mM 塩化コリンを用いた）で20分間インキュベートした後ブラジキニン（10nM)で刺激したが低Naバッファーは〔Ca〕i 上昇に影響しなかった。同様にNa－K ATPase 阻害剤であるウアバイン（0.5mM）で20分間処理したがブラジキニンによる〔Ca〕i 上昇は影響を受けなかった。バッファーのpHを7.4から8.1に上げて20分間インキュベートした後，ブラジキニンの作用を調べたが影響をうけなかった。従って，ブラジキニンによる〔Ca〕i 上昇は Ca^{2+}／Na^{+}antiport，Ca^{2+}/H^{+}antiport，Ca^{2+}／OH^{-} symport などを介する Ca^{2+}流入によるものではないと思われる。ブラジキニンによる〔Ca〕i 上昇が〔Ca〕o にあまり影響されないことから，この〔Ca〕i 上昇は細胞内 Ca^{2+}プールからの Ca^{2+}遊離によるものが主であると考えられる。

2. イノシトールリン脂質の代謝産物の〔Ca〕i への効果

最近，NG－108細胞においてブラジキニンがPIPPを5～30秒で分解するという報告があり，〔Ca〕i 上昇との時間変化がよく一致している。PIPPの分解産物であるジアシルグリセロール，IP1，IP2，IP3，そしてジアシルグリセロールの誘導体で細胞膜を透過する1－オレオイル－2－アセチル－グリセロール（OAG)の〔Ca〕i に対する効果を調べた。ジアシルグリセロール（150μg／mℓ），IP1

(10μM), IP2(10μM), IP3(10μM)を外液に添加したが〔Ca〕i 上昇はみられなかった。OAG(150μg/mℓ)はブラジキニンに比較してゆっくりした〔Ca〕i 上昇を生じた。IP1, IP2, IP3 などのイノシトールリン酸は細胞膜を透過していない可能性があるため，次に細胞内へのイノシトールリン酸の注入を行った。

3. イノシトールリン酸の細胞内注入

120mM KCl，20 mM Hepes バッファーに1－10 mM IP1, IP2, IP3 を溶かして，それぞれガラスピペットに入れ，5－15nA の電流によりイノシトールリン酸を細胞内に入れた。IP3を注入すると細胞内の Quin 2蛍光は IP3 の濃度と電流の強さに依存して増加した。しかし，IP1, IP2は効果がなかった。次に IP3による〔Ca〕i 上昇が〔Ca〕o に依存するかどうか調べた。〔Ca〕oを Ca^{2+}／EGTA バッファーで0.1 μM にした状態でも Quin 2 蛍光は IP3により増加し，〔Ca〕o に非依存性であった。

（総　括）

1. ブラジキニンによる〔Ca〕i 上昇は，主に受容体活性化によって PIPP が分解され産生された IP3が細胞内 Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を遊離させた結果であることが示唆された。

2. high Kによる〔Ca〕i上昇は〔Ca〕$_o$ 依存性であるがIP3による〔Ca〕i上昇は非依存性であることから，IP3が直接，電位依存性Caチャンネルに作用している可能性は少ない。

論文の審査結果の要旨

神経細胞において Ca^{2+} は神経伝達物質の遊離など重要な働きをしているが，本論文は，受容体活性化による Ca^{2+} 動態変動の機構を Ca^{2+} 感受性蛍光色素 Quin 2を用いて調べたものである。受容体活性化によって生じるイノシトールリン脂質の代謝産物の IP3 及び DG 誘導体が Ca^{2+} 動態を大きく変動させるとの知見は神経薬理学的に重要な意味を有しており，学位論文に値するものと考えられる。