The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	神経系の電位依存性カルシウム・チャンネルの生化学的，神経化学的研究
Author(s)	竹村，基彦
Citation	大阪大学，1988，博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36031
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【12】

氏名・(本籍)	竹村基彦（たけむらもとひこ）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8089 号
学位授与の日付	昭和63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	**神経系の電位依存性カルシウム・チャンネルの生化学的，神経化学的研究**
論文審査委員	(主査) 教授 和田 博 (副査) 教授 吉田 博　教授 遠山 正彌

論文内容の要旨

［目　的］

電位依存性カルシウム・チャンネル（ＶＳＣＣ）は神経細胞間の情報伝達に重要な役割りを担っている。近年，イモ貝毒素より単離・精製されたペプチドである，ω－コノトキシンＧⅥＡ（ω－CgTX）とジヒドロピリジン誘導体を始めとする有機カルシウム拮抗薬に対する感受性の違い，あるいは，電気生理学的な性質の違いから，ＶＳＣＣには三種以上のサブタイプが存在することが推定されている。これらの二種のＶＳＣＣ阻害薬の放射性同位元素標識化合物を用いたバインディング・アッセイにより，それぞれの物質に対する受容体の細胞亜分画内局在，脳内部位別局在を比較検討した。ジヒドロピリジン誘導体の受容体については，可溶化，分子量測定も行った。

［方法ならびに成績］

１．合成ω－CgTXはペプチド研究所より購入し，CruzとOliveraの方法でヨウ素化し，逆相ＨＰＬＣで精製した。精製〔^{125}Ｉ〕－ω－CgTXの放射比活性は70－100μCi／nmolであった。ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬の一種である〔^{3}Ｈ〕ニトレンジピン（〔^{3}Ｈ〕ＮＴＰＮ）はNew England Nuclearより購入した。結合平衡状態はWhatman ＧＦ／Ｃグラス・ファイバーフィルターを用いた迅速濾過法により測定した。実験にはWistar系ラット脳を用いた。

２．細胞亜分画は，Whittakerの方法に従った。〔^{3}Ｈ〕ＮＴＰＮ及び，〔^{125}Ｉ〕－ω－CgTXの結合活性はいずれも粗ミトコンドリア分画に最大であったが，ポスト・ミトコンドリア分画では，〔^{125}Ｉ〕－ω－CgTXの結合活性は殆ど見られなかったのに対し〔^{3}Ｈ〕ＮＴＰＮ結合活性は，粗ミトコンドリア分画の１／３が存在し，その比活性も，ホモジネートの88.5%を示した。粗ミトコンドリア分画をCatterall

らの方法で蔗糖密度勾配遠心法により分離すると，両者に対する結合活性は重シナプトソーム分画に最大であった。この分画での，ω－CgTXの結合部位はK_D 8.4pM，Bm 0.15pmol／mgの高親和性部位と，K_D 0.69pM，Bm 2.1pmol／mgの低親和性部位の二種が観察された。

3．ラット脳を0.5%パラフォルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液（pH.7.4）で灌流固定し，切片を作成してから，0.5nM〔^{125}I〕－ω－CgTXとインキュベートしてオートラジオグラフィーを行った。〔^{125}I〕－ω－CgTX結合部位は全脳に広く分布していたが，特に大脳皮質，嗅球のglomerular layer，海馬のmolecular layer，扁桃体，黒質の網状帯，上丘のsuperficial gray layer，小脳皮質のmolecular layer，及び，孤束核に多かった。これに比べて，脳梁，内包，脳弓，海馬采，小脳白質，反屈束等の白質伝導路には少なかった。

4．種々の界面活性剤を用いて，〔^{3}H〕ＮＴＰＮ受容体の可溶化を試みた。10mM ＣＨＡＰＳに安定化材として30%（ｗ／ｖ）グリセロール，150mM NaClを加えると，超遠心上清に，〔^{3}H〕ＮＴＰＮ結合活性の40%が回収された。この可溶化結合活性はセファクリルＳ－500を用いたゲル濾過上での分子量は10,000K以上を示した。界面活性剤として，0.25%（ｗ／ｖ）Brij58，0.025%（ｗ／ｖ）Lubrol ＷＸを加え，超音波処理をおこなうと，結合活性のゲル濾過上の分子量は，1,800Kとなった。蔗糖密度勾配遠心法による分子量は，800Kと推定された。このようにして可溶化した受容体の〔^{3}H〕ＮＴＰＮに対する解離定数は，5.6nMと膜標品の8.6倍であり，可溶化効率は約20%であった。ＣＨＡＰＳ，NaCl，グリセロールで可溶化した受容体は4℃で，半減期1.5日で失活したが，3.3μＭα－トコフェロールの添加により，半減期は3.0日に延長した。ＣＨＡＰＳ，NaCl，Brij 58，Lubrol ＷＸ，を用い超音波処理して可溶化した受容体の結合活性の半減期は，8.5日であり，α－トコフェロールはこの失活速度には影響を持たなかった。

〔総　　括〕

1．ラット脳のジヒドロピリジン受容体とω－CgTX受容体の細胞亜分画における分布は異なっていた。

2．ω－CgTX受容体はラット脳内でシナプスの密な部位に局在しており，既に報告のあるジヒドロピリジン受容体と似た分布を示したが，若干の相違点もあった。

3．〔^{3}H〕ＮＴＰＮ受容体をＣＨＡＰＳ，Brij 58，Lubrol ＷＸ，NaCl，グリセロールを用いて可溶化し，ゲル濾過法，蔗糖密度勾配遠心法により，分子量を測定した。

論文の審査結果の要旨

本研究は，電位依存性カルシウム・チャンネルについて，ω－コノトキシンとニトレンジピンのバインディング・アッセイにより，これらに対する結合部位の生化学的諸性質を比較したものである。電位依存性カルシウム・チャンネルについてはサブタイプの存在が電気生理学的研究から示唆されてきたが，これについての生化学的研究は少なかった。又，脳組織切片を用いた神経化学的手法により，ヒスタミン，ノルアドレナリン，ドーパミンの放出に直接に関与しているのはω－コノトキシン感受性・ジヒド

ロピリジン非感受性の電位依存性カルシウム・チャンネル・サブタイプであることも示した。

以上の結果は神経情報伝達に重要な役割を担う電位依存性カルシウム・チャンネルを生化学的に取り扱い，神経科学上，情報伝達の分子レベルでの理解に寄与したと考えられ，学位論文として価値あるものである。