

Title	In vitro でのシナプス小胞膜融合過程の研究
Author(s)	佐藤, 雅之
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38244
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	佐藤 雅之
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 10796 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科物理系専攻
学位論文名	In vitro でのシナプス小胞膜融合過程の研究
論文審査委員	(主査) 教授 葛西 道生 (副査) 教授 柳田 敏雄 教授 村上富士夫

論文内容の要旨

化学シナプスでは、シナプス前末端に活動電位が伝わるとそこに局在する電位依存性の Ca^{2+} チャネルが開き、それにより細胞内に Ca^{2+} が流入する。これがトリガーとなってシナプス小胞内に蓄えられている伝達物質がシナプス間隙に放出される。この放出機構は現在では開口放出によって起こると考えられており、したがってその最終段階ではシナプス小胞膜とシナプス前膜との間で、膜融合が起こる。

そこで本研究では、この伝達物質放出の最終段階である膜融合現象の分子機構を解明する目的で研究を行った。その結果、ラット大脳皮質より調製したシナプス小胞およびシナプス膜に pH 依存的な膜融合活性があることを、ベシクルどうしの脂質の混合、および内容物の混合が起こることを検出することで示した。この膜融合活性は、トリプシンで処理することで約 80% に減少したことから、何らかのタンパクが、関与していることが示唆された。そこで可溶化-再構成法、つまり、一度シナプス膜タンパクを可溶化し、あらためて膜融合活性のある状態にリポソーム上に再構成することで、膜融合活性タンパクを探索するためのアッセイ系を確立し、その同定を試みた。またアミノ基の修飾剤で、スチルベンの誘導体である DIDS (4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid) が膜融合活性を阻害することがわかったため、 ^3H -DIDS をもちいてオートラジオグラフィーを行った結果、シナプス膜上の 30 KDa のタンパクにのみ ^3H -DIDS が結合することがわかった。このことからシナプス膜の膜融合にはシナプス膜上の 30 KDa のタンパクが何らかの関与をしていることが示唆された。さらに速度論的解析により、シナプス小胞の pH 依存の膜融合活性は主に pH の減少により、リポソームどうしの結合 (aggregation) の速度定数が増加することによるためであるとわかった。

また、最近のいくつかの報告にあるような、膜融合とイオンチャネルの関連を考察する目的で、シナプス小胞上に存在するイオンチャネルの解析も行った。その結果、1 種類のアニオン選択性チャネルと、3 種類のカチオン選択性チャネルが存在することがわかった。

論文審査の結果の要旨

神経細胞間の信号伝達はシナプスという構造を通して行われる。シナプスに於ける信号伝達は以下のように起こると言われている。まず、信号発信側の神経細胞が興奮するとその信号は電気パルスとなって神経軸索を伝搬し神経終末に達する。ここでは電位依存性の Ca^{2+} チャンネルが開き、それにより細胞内に Ca^{2+} が流入し、これがトリガーとなって、シナプス小胞内に蓄えられていた伝達物質がシナプス間隙に放出される。放出された伝達物質はシナプス後膜に存在する受容体によって認識され、再び電氣的興奮となり伝達される。この複雑なシナプス伝達の過程は、多くの研究によってかなり解明されてきた。特に、伝達物質放出の最終過程は、シナプス小胞の膜がシナプス前膜に融合してシナプス小胞の内容物をシナプス間隙に放出する開口分泌によっているとする考えが現在広く受け入れられている。しかし、この膜融合過程の詳細は解っていない。

そこで、申請者はこの膜融合の過程を解明する目的で研究を行った。まず、膜融合の過程を試験管内で検出する方法を確立するために、蛍光消光法を利用して、ラット大脳皮質から調製したシナプス小胞およびシナプス膜とリボソーム膜との間で pH 依存的な膜融合が起こることを発見した。この融合活性は蛋白分解酵素によって消失する部分があることからタンパク質の関与を考え、このタンパク質の単離同定を試みた。その結果、分子量 30 KDa のシナプス膜上にあるタンパク質を突き止めた。また、膜融合の過程を速度論的に解析し、シナプス小胞の膜融合活性は膜小胞の結合の速度定数が増加することによっており、膜融合過程は pH によらないことを示した。また、膜融合と関連すると思われるシナプス小胞上のイオンチャンネルの解析を行い、シナプス小胞膜には 1 種のアニオンチャンネルと 3 種のカチオンチャンネルが存在することを見つけその特徴づけを行った。

以上のように、本論文はシナプスにおける膜融合過程の研究で新しい方法を確立し、関与するタンパク質の同定を行ったもので、分子生理学の分野に重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認める。