



Title	Changes in actin network during calcium-induced exocytosis in permeabilized GH3 cells : calcium directly regulates F-actin disassembly
Author(s)	米田, 美幸保
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43121
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

氏 名	米 田 美 幸 保
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 6 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 1 月 31 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Changes in actin network during calcium-induced exocytosis in permeabilized GH3 cells : calcium directly regulates F-actin disassembly (細胞膜透過性 GH3 細胞におけるカルシウム誘導エキソサイトーシス時のアクチンネットワークの変化)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 村 田 雄 二 (副査) 教 授 内 山 安 男 教 授 奥 山 明 彦

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

エキソサイトーシスでは細胞内カルシウム濃度の上昇がトリガーとなることが明らかになっているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。近年、エキソサイトーシスにおける分泌顆粒と細胞骨格、特にアクチンネットワークとの関係が注目され、エキソサイトーシスでは F-アクチンの脱重合がおこることが報告されているが、純粋な内分泌細胞を用いた報告は少ない。本研究では細胞膜透過状態の GH3 細胞（ラット下垂体腺腫由来細胞）を用いて、カルシウム誘導エキソサイトーシスにおけるプロラクチン（PRL）分泌を測定し、また同じ実験条件下で共焦点レーザー顕微鏡によりアクチンネットワークの変化を観察することにより、両者の関連性について検討した。

【方法】

- (1) PRL 分泌実験においては、培養 GH3 細胞を洗浄後、 $10 \mu\text{M}$ のジギトニン、および各濃度の CaCl_2 を含むバッファー中でインキュベーションした。バッファーを吸引後遠心分離し、上清中の PRL を RIA にて測定した。
- (2) 共焦点レーザー顕微鏡で F-アクチン分布の変化を観察するため、GH3 細胞はガラスボトムディッシュに培養した。まず、無処理の細胞を Zamboni 液にて固定した後 $1.6 \mu\text{M}$ の FITC-Phalloidin で F-アクチンを染色し、非刺激状態の F-アクチンの分布を観察した。次に、ジギトニンおよびカルシウム刺激が F-アクチン分布におよぼす作用を見るため、細胞を洗浄後 $10 \mu\text{M}$ のジギトニン、またはジギトニンと $1 \mu\text{M}$ の free Ca^{2+} を含むバッファー中でインキュベーションし、同様に Zamboni 液にて固定、染色した。また、生細胞におけるカルシウム刺激による F-アクチン分布の変化を見るためには、固定細胞同様インキュベーションした細胞を洗浄し、ただちに $1.6 \mu\text{M}$ の FITC-Phalloidin で F-アクチンを染色した。それを共焦点レーザー顕微鏡で観察し、それぞれ細胞膜からの距離と蛍光強度を数値化することにより解析した。また、 Ca^{2+} 刺激後の F-アクチン分布の経時的变化も同様に観察、解析した。
- (3) アクチンの脱重合抑制作用のある薬剤、Phalloidin と促進作用のある Cytochalasin B が PRL 分泌と F-アクチン分布の変化におよぼす影響を観察した。

【成績】

- (1) $1 \mu\text{M}$ の free Ca^{2+} 存在下では細胞膜透過状態の GH3 細胞からの PRL 分泌は亢進し、20分後にプラトーに達した。一方、 Ca^{2+} 非存在下では PRL 分泌は80分後まで徐々に直線的に増加した。その差は20分後に最大であった。

また、 Ca^{2+} 濃度 $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ の間では PRL 分泌は Ca^{2+} 濃度依存性であった。

(2) 非刺激状態の GH3 細胞では F-アクチンは主に細胞の辺縁部にみられた。固定細胞の観察によりジギトニンによる F-アクチン分布への影響は認められなかった。 Ca^{2+} 刺激では辺縁部の染色強度は低下し不均一となったが、細胞内部の染色強度は増加した。また、細胞辺縁部においては F-アクチンは Ca^{2+} 刺激後 1 分以内に 5 分後と同じレベルまで減少したが、細胞内部では 1、2 分後では変化がなく、5 分後に染色強度の増加を認めた。

(3) Phalloidin の存在下ではいずれの Ca^{2+} 濃度においても分泌の抑制が見られた。F-アクチンの染色性は全体に著明に低下し、 Ca^{2+} 刺激後に細胞内部の染色強度がごくわずかに上昇したのみであった。一方、Cytochalasin B 存在下では、分泌の抑制は高濃度の Cytochalasin B 存在下において軽度認められたのみであった。顕微鏡では斑点状の F-アクチンの集積が見られたが、全体的な F-アクチンの分布に対する影響は小さく、カルシウム刺激による F-アクチンの分布の変化も認められた。しかしその変化量は小幅となった。

【総括】

細胞膜透過状態の GH3 細胞を用いることにより、細胞質内のカルシウム濃度の上昇がエキソサイトーシスと F-アクチン分布の変化に与える影響を明らかにした。

カルシウム誘導エキソサイトーシスにおいては細胞辺縁部の F-アクチンの脱重合がおこっており、カルシウムが直接的にアクチンネットワークを調節していることが示唆された。これは、F-アクチンは分泌顆粒が細胞膜へ移動するのを妨げるバリアとなっているという仮説を支持するものである。

論文審査の結果の要旨

一般にエキソサイトーシスは、細胞内カルシウム濃度の上昇がトリガーになって起こることが明らかになっており、細胞骨格の構成成分のひとつであるアクチンが関与していることが知られている。従来、この分野における研究の多くは神経細胞を用いて行われており、内分泌細胞におけるエキソサイトーシスのメカニズムの詳細については未だ不明の部分が多く残されている。本研究では、内分泌細胞のモデルとして細胞膜透過処理を施した GH3 細胞を用いて、エキソサイトーシス時の F-actin の変化を初めて定量的に評価することにより、カルシウムが直接的にアクチンネットワークに作用し、分泌顆粒の細胞膜への移動を制御している可能性を示した。まず、細胞に Digitonin 処理を行い種々の細胞内外カルシウム濃度で平衡させたときの Prolactin (PRL) 分泌を検討し、かつ F-actin 安定化剤である Phalloidin 投与時の細胞内カルシウム変動による PRL 分泌の抑制と Cytochalasin B による部分的抑制を観察した。次に共焦点レーザー顕微鏡を用いて固定細胞、生細胞でカルシウム刺激を行った時、細胞辺縁部の F-actin が減少し、その変化は Phalloidin 添加により抑制されることを見いだした。これらのことから細胞膜近傍の F-actin network はエキソサイトーシスに関してはバリアとしての役割を持ち、細胞内カルシウムはその機能を調節し、エキソサイトーシス誘導に関わっていることが示唆された。

以上の研究は内分泌細胞で初めてアクチンのエキソサイトーシスにおける役割を解明した点で重要な意義があり、その手法も独創的である。従って、本論文は学位の授与に値すると考えられる。