



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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43121">https://hdl.handle.net/11094/43121</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">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	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 16639 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、 $10\mu M$ のジギトニン、および各濃度の $CaCl^2$ を含むバッファー中に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 $1.6\mu M$ 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 $10\mu M$ のジギトニン、またはジギトニンと $1\mu M$ のfree  $Ca^{2+}$ を含むバッファー中に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 $1.6\mu M$ 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)  $1\mu M$ 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、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度0.1~10  $\mu\text{M}$ の間ではPRL分泌は  $\text{Ca}^{2+}$ 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。 $\text{Ca}^{2+}$ 刺激では辺縁部の染色強度は低下し不均一となつたが、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  $\text{Ca}^{2+}$ 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  $\text{Ca}^{2+}$ 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、 $\text{Ca}^{2+}$ 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に認められたのみであった。顕微鏡では班点状の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。