

氏名・(本籍)	おお いずみ のぶ ゆき 大 泉 信 行
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 632 号
学位授与年月日	昭和54年 3月27日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻
学位論文題目	シナプス表面膜のCaイオン取り込みに関する研究
論文審査委員	(主査) 教 授 小 西 和 彦 教 授 柴 岡 孝 雄 助 教 授 四 釜 慶 治

## 論 文 目 次

第一章	緒 論
第二章	材料と方法
第三章	実験結果
第一節	P <sub>2</sub> 分画のCa <sup>2+</sup> 取り込み
第二節	LysisしたP <sub>2</sub> 分画の細分画
第三節	シナプス表面膜分画のCa <sup>2+</sup> 取り込みおよびCa, Mg-ATPase活性に対するNa <sup>+</sup> の効果
第四節	シュウ酸存在下でのシナプス表面膜のCa <sup>2+</sup> 取り込みおよびCa, Mg-ATPase活性
第五節	シナプス表面膜分画のCa <sup>2+</sup> 取り込みに対するcysteineの効果
第六節	シナプス表面膜分画のCa <sup>2+</sup> 取り込みとCa, Mg-ATPase活性との平行性
第四章	考 察
第一節	Ca <sup>2+</sup> 取り込みを担う細胞小器官の同定
第二節	シナプス表面膜断片のCa <sup>2+</sup> 取り込みの機構
第五章	要 約
	謝 辞
	引用文献
	表および図

# 論文内容要旨

## 第一章 緒 論

神経の機能において $\text{Ca}^{2+}$ は、いくつかの重要な役割を担っており、興奮性の維持および神経伝達物質の遊離にも $\text{Ca}^{2+}$ が必須である事が知られている。また神経細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度は $10^{-7}\text{M}$ であり、細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の $10^{-3}\text{M}$ に比べ著しく低く保たれており、神経細胞表面膜には $\text{Ca}^{2+}$ を細胞外に排出する機構の存在が示唆されている。一方神経細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が高まると興奮性が不可逆的に失われる事が知られており、この $\text{Ca}^{2+}$ の排出の機構が神経の機能維持に重要な役割を果たしている事を示している。

一方、*in vitro*の研究で、脳ミクロゾームがATP、 $\text{Mg}^{2+}$ に依存して $\text{Ca}^{2+}$ を取り込む事がOtsukaらおよびYoshidaらにより独立に見出された。この脳ミクロゾームの $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みは、 $\text{Ca}^{2+}$ の関与する生理的に重要な上記の機能のいずれかと関連するものと期待されるが、脳ミクロゾーム分画中の $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みを担う細胞小器官は未だ明らかにされず、したがってその生理的意義も不明のままであった。

著者は、ブタ大脳の粗ミトコンドリア分画( $\text{P}_2$ 分画)および $\text{P}_2$ 分画をさらに細分画して得られるシナプス表面膜分画を用い、脳組織中の $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みを担う細胞小器官を同定するとともに、その $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みの機構を、 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みの生理学的意義を明らかにすることを目的として研究した。

本研究で得られた結果から、 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みはinside-outのvesicleを形成したシナプス表面膜によるものであると結論するのが妥当であり、また $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みとCa、Mg-ATPase活性とは密接な関連のある事が示唆される。さらに、上記の脳ミクロゾーム分画にみられる $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みも、このinside-out vesicleを形成したシナプス表面膜によるものである事を強く示唆する結果も得た。

## 第二章 材料と方法

ブタ脳を10(W/W)%sucrose中でhomogenizeし、 $1000\times g$ で上清に、 $10,000\times g$ で沈殿にくる分画を粗ミトコンドリア分画( $\text{P}_2$ 分画)として得た。これを5mM Tris-HCl buffer pH 8.1を用いてlysisした後、Jones & Matusの方法を若干変更した方法でショ糖密度勾配遠心法により細分画し、ミトコンドリア、シナプス表面膜、ミエリンの三分画を得た。

$\text{Ca}^{2+}$ 取り込みの反応混液の組成は次の通りである。 $10\mu\text{M } ^{45}\text{CaCl}_2$ , 1mM ATP, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 20mM KCl, 20mM Tris-maleate buffer pH 6.8, 10(W/W)%sucrose, 1mM  $\text{NaN}_3$  およびタンパク量にして0.1~0.2mg/mlの $\text{P}_2$ 分画またはlysisした $\text{P}_2$ 分画

であった。反応は 24°C で行ない、一定時間後に反応液 1 ml を取り、Millipore filter を用い吸引ろ過し、さらに 10 mM Tris - maleate buffer pH 6.8, 20 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 10 % sucrose で filter を洗浄後、filter に残った radioactivity を測定した。

細分画した試料を用いた場合は、反応液には、sucrose および NaN<sub>3</sub> は加えなかった。また filter の洗浄には、2.5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 10 mM Tris - maleate buffer pH 6.8 を用いた。

Ca, Mg - ATPase 活性の測定は、Ca<sup>2+</sup> 取り込みの測定と同様の条件下で行なった。CaCl<sub>2</sub> の代わりに 0.1 mM ethylenglycol bis (β - aminoethyl - ether) - N, N' - tetraacetic acid を加えた場合との差を Ca, Mg - ATPase 活性とした。

### 第三章 実験結果

#### 第一節 P<sub>2</sub> 分画の Ca<sup>2+</sup> 取り込み

P<sub>2</sub> 分画は、Ca<sup>2+</sup> 取り込みはみられず、lysis 後にはじめて Ca<sup>2+</sup> 取り込みがみられた。Lysis した P<sub>2</sub> 分画の Ca<sup>2+</sup> 取り込み量は約 2 μ moles / g protein であった。P<sub>2</sub> 分画中には、ミトコンドリア、ミエリン断片、およびシナプトゾームなどが含まれ、シナプトゾーム内には、ミトコンドリア、シナプス小胞および ER 様の膜が含まれており、P<sub>2</sub> 分画を低張液にさらし lysis すると、シナプトゾームは内容物を失ないシナプス表面膜ゴーストとなる事が知られている。したがって lysis した P<sub>2</sub> 分画でみられた Ca<sup>2+</sup> 取り込みを担う細胞小器官は、lysis により断片化されたシナプス表面膜か、あるいは、lysis でシナプトゾーム外に現われたシナプトゾーム内細胞小器官などの可能性がある。Ca<sup>2+</sup> 取り込みを担う細胞小器官は lysis 前に外液中に直接さらされているものか、あるいは lysis 後にはじめて外液に接するものであるかのいずれかを明らかにする目的で P<sub>2</sub> 分画の trypsin 処理を行なった。その結果、trypsin 処理した P<sub>2</sub> 分画は lysis 後でも Ca<sup>2+</sup> 取り込み活性を示さない事が明らかになった。Insoluble trypsin で P<sub>2</sub> 分画を処理した場合も同様の結果を得た。したがって、trypsin の効果は、シナプトゾーム内等の細胞小器官に作用したためではなく、表面膜に作用した結果であると考えるのが妥当である。すなわち、Ca<sup>2+</sup> 取り込み機構は、シナプトゾーム内等の内部に存在した膜ではなく、膜表面に存在すると示唆された。

Ca, Mg - ATPase 活性は、P<sub>2</sub> 分画でもみられるが、lysis により 60 % の増加を示した。P<sub>2</sub> 分画を trypsin 処理するとその後の lysis の有無にかかわらず Ca, Mg - ATPase 活性は全くみられなかった。

#### 第二節 Lysis した P<sub>2</sub> 分画の細分画

Lysis させた P<sub>2</sub> 分画を Jones & Matus の方法で、ショ糖密度勾配遠心法により、ミエリン、シナプス表面膜、ミトコンドリアの三分画に分画し、Ca<sup>2+</sup> 取り込み活性および Ca, Mg -

ATPase 活性の分布を調べた。その結果、両活性ともにシナプス表面膜分画で最大であり、 $\text{Ca}^{2+}$  取り込み量は  $4 \sim 5 \mu \text{ moles/g protein}$ ,  $\text{Ca, Mg-ATPase}$  活性は約  $40 \mu \text{ moles/g protein} \cdot \text{min}$  であった。そこで以下の実験は、シナプス表面膜分画を用いて行なった。

なお比較的高い  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み活性を得るには、 $20 \text{ mM KCl}$  存在下でショ糖密度勾配遠心を行なう必要のある事を明らかにした。

### 第三、四、五節

Nakamura & Konishi は脳ミクロゾームの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みは、cysteine により阻害されるという、他の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みにはみられない特徴のある事を明らかにした。また脳ミクロゾームの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み量は、 $\text{Na}^+$  により減少し、高濃度のシュウ酸存在下で増加する事が知られている。

シナプス表面膜分画でも、cysteine により  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みは完全に阻害された。また  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み量は、同様に  $\text{Na}^+$  の共存により減少し、 $5 \text{ mM}$  シュウ酸の共存により増加した。これらの事は、脳ミクロゾームの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みと、シナプス表面膜分画の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みとは同一の現象を反映している事を示すものである。

### 第六節 シナプス表面膜分画の $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みと $\text{Ca, Mg-ATPase}$ 活性との平行性

上述のように  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みと  $\text{Ca, Mg-ATPase}$  活性とは、 $\text{P}_2$  分画の trypsin 処理によりともに失なわれ、またショ糖密度勾配遠心による細分画での分布が一致する事から密接な関連のある事が示唆された。そこで両者の関連について検討した。

シナプス表面膜分画の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みと、 $\text{Ca, Mg-ATPase}$  活性とは、ともに N-ethyl-maleimide (NEM) により阻害され、かつ NEM の阻害に対しては、ATP は保護効果をもたなかった。また両者は温度依存性、 $\text{Mg}^{2+}$  濃度依存性において同様の傾向を示した。これらの結果は、 $\text{Ca, Mg-ATPase}$  活性と  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みとの共役を強く示唆するものである。

## 第五章 考 察

### 第一節 $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みを担う細胞小器官の同定

以上の実験結果から、lysis した  $\text{P}_2$  分画でみられた ATP 依存性  $\text{Ca}^{2+}$  取り込み機構は、シナプトゾーム内の細胞小器官にではなく、シナプス表面膜に存在する事が明らかにされた。

このシナプス表面膜断片の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みは、シュウ酸の共存により増大する事から、 $\text{Ca}^{2+}$  の vesicle 内への輸送であると考え事ができる。

神経細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は、細胞外液に比べ著しく低く保たれており、神経細胞表面膜には、 $\text{Ca}^{2+}$  を濃度勾配に逆らって pumping-out する機構の存在が示唆されている。したがって本研究で

観察された  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みは、inside - out の vesicle を形成したシナプス表面膜断片による  $\text{Ca}^{2+}$  の pumping - in であると考えるのが妥当であろう。Inside - out の vesicle は赤血球膜等で作られているが、興奮膜では、はじめてである。 $\text{Ca}^{2+}$  取り込みを担う vesicle が inside - out の vesicle である事の直接の証明は今後の課題である。

また脳ミクロゾームの  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みもまた、その中に含まれる inside - out の vesicle を形成したシナプス表面膜断片による  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みであると結論される。

## 第二節 シナプス表面膜断片の $\text{Ca}^{2+}$ 取り込みの機構

$\text{Ca}^{2+}$  取り込み速度は、化学量論的には、Ca, Mg - ATPase 活性に比べ著しく小さかったが、種々の操作および様な反応条件下での傾向は等しく、シナプス表面膜分画の  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みは、Ca, Mg - ATPase によるものであると考えられる。筋小胞体膜断片 (SRF) の場合と異なり、シナプス表面膜断片での  $\text{Ca}^{2+}$  取り込みは cysteine および  $\text{Na}^+$  の影響を受けるという特徴がある。Cysteine および  $\text{Na}^+$  の作用機構の解明は今後の課題である。

## 論文審査の結果の要旨

神経細胞内のカルシウムイオン濃度は細胞外のそれに較べ著しく低い。このカルシウムイオンの細胞内外の濃度差は細胞膜の Ca ion pump で維持されていると考えられるが単離した神経細胞膜 vesicle を用いてこの pump 機構を実証した例はない。一方脳ミクロソームは ATP 依存性のカルシウムイオン取り込みを行うが、その機能をもつオルガネラおよび生理学的意義は不明である。

本論文は上記の問題の解明を目的としたもので、ブタ脳のホモジェネートから ATP 依存性カルシウムイオン取り込みを行う分画を分離してオルガネラを同定し、またカルシウムイオン取り込みと ATPase 活性の関係を検討し、取り込み機構を推論したものである。

著者はまずブタ脳のホモジェネートから、分別遠心法で、ミトコンドリアに富む分画 ( $P_2$ ) をえた。この  $P_2$  分画は、低張液で lysis させてはじめてアザイドで阻害されない (ミトコンドリアによらない) ATP 依存性カルシウムイオン取り込み活性を示した。 $P_2$  をトリプシンまたは不溶化トリプシンで処理すると、lysis 後も取り込み活性は発現されなかった。これらの結果はカルシウムイオン取り込みはシナプス表面膜によることを示すと結論している。

次に lysis した  $P_2$  を蔗糖密度勾配遠心法で分画し、カルシウムイオン取り込み活性がシナプス表面膜分画に回収されることを見出している。この操作の際にカリウムイオンを共存させることで、取り込み活性の高い試料をえることに成功している。この取り込みは蔞酸の添加で増加することから、シナプス表面膜断片は vesicle を作っていると推論している。 $P_2$  を lysis させる際の条件を検討し、取り込み活性の高い試料は、赤血球膜で inside-out vesicle かつ形成される条件でえられることを見出している。

Ca, Mg-ATPase 活性とカルシウムイオン取り込み活性の関係を種々の条件下に検討し、両者間に密接な関連のあることを指摘している。

一方、脳ミクロソームの ATP 依存性カルシウムイオン取り込みも、シナプス表面膜断片によることを阻害剤を用いた結果から結論している。

以上の実験結果をもとに、著者はシナプス表面膜は断片化して inside-out vesicle を作り、Ca, Mg-ATPase によるカルシウムポンプにより、カルシウムイオンの pumping in を行っていること、またこれは *in site* では神経細胞膜によるカルシウムイオンの pumping out の現象であると推論している。

本研究は、カルシウムイオン輸送機能をもつ興奮性膜 vesicle が作られる強い可能性を示したこと、また、脳ミクロソームの ATP 依存性カルシウムイオン取り込み活性がシナプス表面膜由来であることを明かにした点で神経生理学、生体膜イオン制御機構の今後の研究に重要な知見をあたえるものであり、理学博士の学位論文として適当である。

また、本論文は著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。

よって大泉信行提出の論文は理学博士の学位論文として合格と認める。