

氏 名	小 川 正 晴
	お がわ まさ はる
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	医 博 第 533 号
学位授与の日付	昭 和 54 年 7 月 23 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	医 学 研 究 科 生 理 系 専 攻
学位論文題目	Responses of the transmembrane potential coupled to the ATP-evoked catecholamine release in isolated chromaffin granules (クロマフィン顆粒における ATP によるカテコールアミン放出に 共役した顆粒膜電位の応答) (主 査) 教 授 荒木辰之助 教 授 藤 原 元 始 教 授 佐々木和夫
論文調査委員	

論 文 内 容 の 要 旨

クロマフィン顆粒などの分泌顆粒では、 Mg^{2+} -ATP によりその貯蔵物質（ホルモン等）が顆粒より放出される。顆粒膜 Mg^{2+} -ATPase の存在が見いだされているものの、その放出機構に関しては明らかにされていない。申請者は牛副腎髄細胞のクロマフィン顆粒において、 Mg^{2+} -ATP による顆粒膜電位の脱分極現象を見だし、顆粒からのエピネフリン放出の素過程を検討した。

膜電位依存性の蛍光変化を示すシアニン系色素 diS-C₃-(5) を用い、光学的に顆粒膜電位を測定した。この方法は神経膜、筋膜、赤血球膜、ミトコンドリア膜等々において確立されたものである。クロマフィン顆粒は 360 mOsm の 1 mM K⁺ 溶液中で約 -45 mV（顆粒内側が負）の膜電位を示した。この膜電位は主として K⁺ の拡散電位として解釈された。1 mM Mg^{2+} 、0.2 mM ATP を添加すると顆粒膜電位は -45 mV より +27 mV へと脱分極し、同時に顆粒からのエピネフリン放出がみられた。この脱分極 (ΔE_m) およびエピネフリン放出 (Q) は Mg^{2+} -ATP に特異的であり、その他の二価イオン (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) およびヌクレオチド (AMP, ADP, cAMP, GTP, cGMP) の組合せでは、このような現象はみられなかった。この脱分極巾と Mg^{2+} および ATP 濃度との間には Michaelis-Menten 様の関係がみられ、これより Mg^{2+} 、ATP の各平衡定数 K_m を求めるとそれぞれ 0.1 mM, 0.22 mM であった。これらの値はエピネフリン放出の速度解析から求めた各 K_m 値とはほぼ一致した。更に ΔE_m とエピネフリン放出速度 ($\dot{Q}$) の間には平行関係がみられた。 ΔE_m および Q の時間経過をみると、顆粒膜電位は Mg^{2+} -ATP 添加後 1 分以内に脱分極レベルに達し、10 分以上にわたってそのレベルを保持したが、顆粒からのエピネフリン放出は ΔE_m に比例した Q でもって 15 分以上持続し、含有エピネフリンを 100% 放出した。また放出曲線は一次の拡散放出モデルで説明できた。次に脱分極に伴う一価イオンの輸送を調べてみた。一般に膜透過性が小さいとされる SO_4^{2-} , PO_4^{3-} で Cl^- を置換した場合、 ΔE_m および Q は共に抑制された。この場合、顆粒膜 ATPase の ATP 分解能には変化がないことが知られている。また、ミトコンドリア内膜 ATPase の構成因子 $F_0(H^+$ -チャネル) の阻害剤ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCCD)

を添加した場合、 ΔE_m は拮抗的に抑制され、 Q も抑制された。一方、 K^+ イオノフォアであるバリノマイシン存在下に顆粒の K^+ 平衡電位を測定したところ、 ΔE_m の進行と同時に $0mV$ へと移行することが示された。これらの結果は、 ΔE_m に伴い顆粒膜の Cl^- 、 H^+ 、 K^+ 透過性が増大することを示唆する。また、これらの現象は、著しい温度依存性を示し、これらイオンが担体あるいはチャンネルを介して輸送されることを示唆している。

以上の結果より、 Mg^{2+} -ATP によるクロマフィン顆粒からのエピネフリン放出機構として、① 顆粒膜 Mg^{2+} -ATPase の賦活化、② ATP 分解に共役した一価イオンの透過性の増大、③ イオンの輸送に随伴したエピネフリンの顆粒からの拡散放出の3つの素過程の関与が示唆された。

論文審査の結果の要旨

分泌顆粒では、 Mg^{2+} -ATP により特異的に、顆粒内部に貯留されているホルモン等が放出されることが知られている。申請者は、牛副腎髄質クロマフィン顆粒の顆粒膜電位の測定、アドレナリン放出の速度論的解析等により、 Mg^{2+} -ATP の顆粒への作用機序を調べた。顆粒膜電位は神経・筋細胞膜の静止膜電位に類似し、主として K^+ の拡散電位として解釈された。 Mg^{2+} -ATP によって特異的に顆粒膜電位は脱分極し、この脱分極中に比例した速度定数でもってアドレナリンが顆粒より拡散放出されるのがみられた。その過程において、顆粒膜 ATPase による ATP 分解に伴い、 K^+ の流出、 H^+ の流入が誘起されると同時に、 Cl^- がこの過程に不可欠であることを明らかにした。これらの知見は、 Mg^{2+} -ATP による顆粒からのアドレナリン放出には、顆粒膜を通してのイオンの輸送増大が駆動力源として作動していることを示唆している。本研究は、副腎髄質細胞でのカテコールアミン放出機構の解明に貢献すると同時に、内分泌系細胞あるいは交感神経終末端等におけるホルモン放出機構の解明にも寄与するところが大きい。

よって、本論文は医学博士の学位論文として価値あるものと認める。