

學位審查報告書

(ふりがな)	おおた やすみ
氏 名	太 田 安 美
学位（専攻分野）	博 士 （ 理 学 ）
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) 電子線トモグラフィによるイネキシン電気シナプスの 三次元構造に関する研究	
論 文 調 査 委 員	(主査) 藤吉 好則 教授 七田 芳則 教授 平野 丈夫 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	太田 安美
論文題目	電子線トモグラフィによるイネキシン電気シナプスの三次元構造に関する研究		
(論文内容の要旨) アメリカザリガニの側方巨大線維におけるイネキシン-ギャップ結合は、速い情報伝達を行う主要な機構として、逃避行動に重要な役割を果たす。このギャップ結合はその両側に小胞が局在する特徴的な構造が見られるが、小胞に関する構造と機能についてはほとんど解明されていない。そこで申請者はアメリカザリガニのギャップ結合とその近傍に局在する小胞 (gap junctional vesicle) の三次元構造を電子線トモグラフィ法により解析した。その結果、ギャップ結合近傍の gap junctional vesicle は細いフィラメントによってイネクソンにアンカーされ、ほとんど全ての gap junctional vesicle も互いに結び付けられていることが明らかになった。また固定、染色された試料では gap junctional vesicle 内に電子密度の高い領域が存在し、その膜は滑らかな膜ではなく膜上に突出する部分が存在することが観察された。電子顕微鏡像においてシナプス小胞は、固定条件や小胞に含まれる神経伝達物質の種類に依存して異なる様相を示すことが知られていたため、gap junctional vesicle 内に含まれる分子を解明するために、様々な固定条件を施して gap junctional vesicle 内の電子密度を比較した。その結果、gap junctional vesicle はタンパク質ではなく、モノアミンまたはヌクレオチド分子を内包している可能性が示唆された。次に、これらの物質を取り込むトランスポーターの gap junctional vesicle 膜上での局在を調べるために、小胞モノアミントランスポーターと小胞ヌクレオチドトランスポーターの抗体を用いて免疫電子顕微鏡観察を行った。gap junctional vesicle 膜上のいくつかの突出部分が小胞ヌクレオチドトランスポーター抗体により標識され、ヌクレオチドが小胞内に取り込まれる可能性が示唆された。しかし、これらの突起は小胞モノアミントランスポーターの抗体では標識されなかった。また、gap junctional vesicle と興奮性の化学シナプス小胞を比較するために、アメリカザリガニの側方巨大線維における興奮性の化学シナプスの三次元構造も解析した。ヌクレオチドを含まないとされる興奮性の化学シナプスの小胞内には高い電子密度は観察されず、小胞の大きさは gap junctional vesicle の直径が約 60 nm であるのに対して約 45 nm と全く異なっていた。さらに興奮性の化学シナプス小胞の膜は小胞ヌクレオチドトランスポーター抗体により標識されず、ヌクレオチドを含まないことを裏付けた。gap junctional vesicle と興奮性化学シナプス小胞の比較、固定条件の化学的機序、それを確かめる固定条件変化による小胞の電子顕微鏡像における電子密度の違い、さらに免疫電子顕微鏡の結果は、興奮性化学シナプス小胞はヌクレオチドを含まないが gap junctional vesicle は含んでいることを示唆している。ギャップ結合の構造が物理的、化学的な外部刺激によって変化することも鑑み、‘神経伝達物質又は神経制御物質として知られるヌクレオチドを内包する gap junctional vesicle がアメリカザリガニ側方巨大線維のギャップ結合においてシグナル伝達の重要な役割を担う。’ というモデルを提案した。			

(論文審査の結果の要旨)

比較的大きな分子も透過できる2つの細胞をつなぐ細胞接着性のチャネルとして、ギャップ結合チャネルが知られている。このチャネルは生物学的な重要性が認められており、脊椎動物のコネキシンというギャップ結合チャネルの研究が進められてきた。一方、無脊椎動物のイネキシンが形成するギャップ結合チャネルについての研究は、比較的少ない状態である。中でも、逃避行動に重要な役割を果たすとされ、速い情報伝達を担う機構と考えられているイネキシンのギャップ結合の構造学的情報は極めて限られている。そこで申請者はアメリカザリガニの側方巨大線維に見出されているギャップ結合構造を、その近傍に局在する小胞と共に、電子線トモグラフィ法を用いて解析した。その立体構造解析の結果、ギャップ結合近傍のギャップ結合小胞は、細いフィラメントによってギャップ結合チャネルにアンカーされると共に、ほとんど全ての小胞が互いに結び付けられていることを明らかにした。また、その小胞内に高い電子密度を与える物質が存在すること、そして、その小胞の膜は単に滑らかなではなく、膜上に突出する構造体が存在することを観察した。電子顕微鏡観察において、シナプス小胞は固定条件や小胞に含まれる神経伝達物質の種類などに依存して異なる様相を示すことが知られている。それゆえ、小胞内に含まれる分子を同定するために、様々な固定条件を検討して、小胞内の電子密度の解析を行った。その結果、ギャップ結合小胞内にはタンパク質ではなく、モノアミンまたはヌクレオチド分子が存在している可能性が示唆された。しかも、電子線トモグラフィ法により解析された立体構造において、ギャップ結合小胞には膜上に突出する構造体が認められたので、小胞内に物質を取り込む分子であるトランスポーターの局在の有無を調べるために、小胞モノアミントランスポーターと小胞ヌクレオチドトランスポーターの抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察を行った。その結果、ギャップ結合小胞膜上のいくつかの突出部分が、小胞ヌクレオチドトランスポーター抗体により標識され、ヌクレオチドが小胞内に取り込まれる可能性が示唆された。一方、これらの突起は小胞モノアミントランスポーターの抗体では標識されなかった。また、ギャップ結合小胞と興奮性の化学シナプス小胞の違いを解明するために、アメリカザリガニの側方巨大線維における興奮性の化学シナプスの立体構造も電子線トモグラフィ法を用いて解析した。ヌクレオチドを含まないとされる興奮性の化学シナプスの小胞内には高い電子密度は観察されなかった。小胞の大きさはギャップ結合小胞の直径が約 60 nm であるのに対して化学シナプス小胞は約 45 nm と大きく異なっていることを明らかにした。さらに、興奮性の化学シナプス小胞の膜は小胞ヌクレオチドトランスポーター抗体により標識されず、ヌクレオチドを含まないことを明らかにした。イネキシンのギャップ結合構造の研究に基づいて、ATP のようなヌクレオチドを内包する小胞が、アメリカザリガニ側方巨大線維のギャップ結合のシグナル伝達において重要な役割を担うというモデルを提案した。

以上のように、本論文は博士(理学)の学位論文として十分に価値あるものと認める。また、平成23年5月10日論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公開可能日： 年 月 日以降