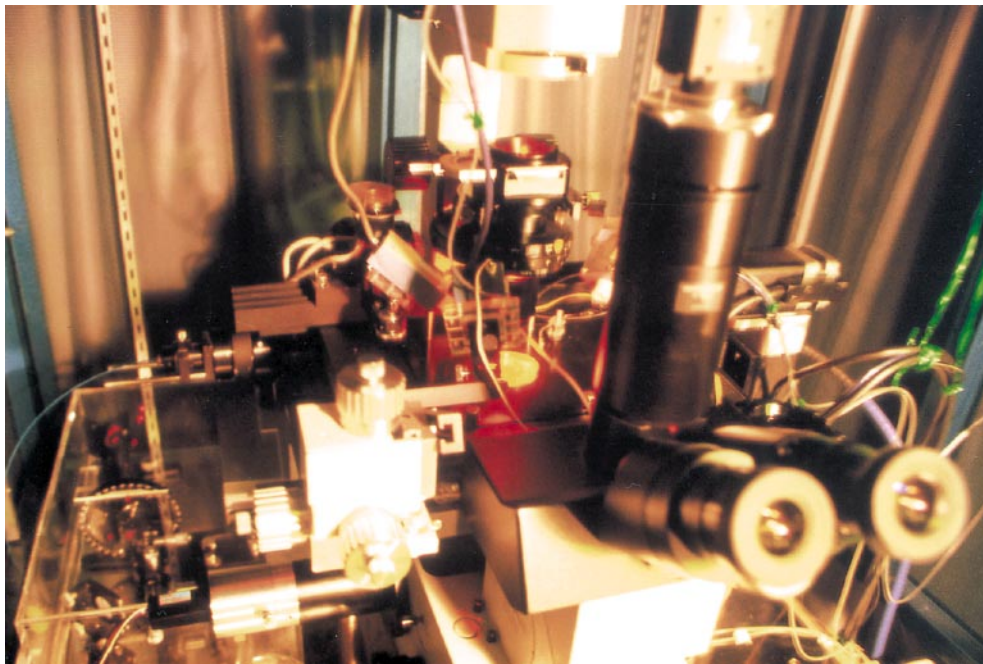


Calcium signaling in secretion 分泌におけるカルシウムシグナル

プロジェクトリーダー 河 西 春 郎

岡崎国立共同研究機構 生理学研究所
教授



1. 研究の目的

高等動物の高次機能は、細胞内で作られた分子を細胞外に放出し（分泌）、他の細胞がそれを利用することで成し遂げられます。たとえば、脳を作る神経細胞では、軸策終末で神経伝達物質が放出されることにより、神経細胞間の情報の伝達が行われ、これが我々の精神活動の源となります。また、生体の恒常性は内分泌細胞からのホルモンの分泌によって保たれます。更に、血液細胞からのサイトカインの分泌によって生体防御機構が働き、外分泌腺からの消化酵素の分泌によって、食物が消化されます。分泌は細胞内に貯えられた分泌物質を含む分泌小胞膜が細胞膜に融合し、小胞内が細胞外に開くことにより起きるので、開口放出とも呼ばれます。開口放出は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇で調節され、その根本的機構は異なる細胞でも同一と考えられおり、その解明は人類に残された最大級の問題の一つです。開口放出に関連する分子群のリストアップは進んで来ていますが、それらの膜融合微細形態過程への関与はまだほとんど明らかになっていません。本研究では、新しい生物物理学的研究手法を駆使して、開口放出を制御すると考えられる小胞の分布と運動、融合細孔 (fusion pore) 形成などの分子微細形態過程の解明とカルシウムなどの調節因子の調節様式、それらの標的分子の同定を行なう事を目標とします。



2. 研究の内容

私たちは、生きた細胞の開口放出の定量的実験系の構築に成功し、開口放出の速さが分泌小胞や細胞の種類によって著しく異なる事をつきとめました。こうして、異なる分泌細胞のカルシウムシグナルや開口放出を定量的に比較検討して、開口放出機構の解明を目指す研究領域が開かれました（比較分泌生物学）。様々の分泌細胞（1-4）のカルシウム依存性開口放出を機能、形態、分子のすべての角度から検討し（5-7）、分泌現象及びその多様性の要因を解明します。

（1）膵臓外分泌腺細胞のカルシウムシグナル

外分泌腺細胞には消化酵素の開口放出と電解質液の分泌の二つの機能がありいずれも細胞内カルシウムイオンによって調節されています。外分泌腺細胞には著しい極性がある、カルシウムシグナル、開口放出、イオンチャネルの活性化が方向性を持って起きます。二光子励起断層画像法を用いて、生きた腺構造を保ったままの外分泌腺細胞で、極性を持った分泌機能を実測します。

（2）膵臓ベータ細胞のインスリン分泌

膵臓ランゲルハンス島のβ細胞は血液中のグルコース濃度上昇を検知してインスリンを分泌する細胞で、この分泌が障害されると糖尿病になります。我々は、グルコース検知に環状ヌクレオチド合成酵素が重要な役割を果たすことを解明しました。この酵素は開口放出に関係する特定の蛋白質をリン酸化することで作用を発現すると考えられ、CALI法などを用いて、この蛋白質の同定を目指します。また、多光子励起法を用いたランゲルハンス島の画像解析によりグルコース検知からインスリン放出にいたる分子過程を可視化します。

（3）内分泌細胞の基本、副腎髄質細胞

副腎髄質細胞は、生化学との対応が取れやすい内分泌細胞であり、ケイジドカルシウム試薬、アンペロメトリー法、CALI法、分泌標識急速凍結法などの新しい方法を駆使して、開口放出の分子機構の解明を行います。

（4）シナプス小胞動態の解析のための神経下垂体及び培養中枢神経細胞標本

下垂体後葉には神経の軸索終末が集まっており、ホルモンを含む大型顆粒及びシナプス小胞が多数観察され、シナプス前終末と同様な構造を持っています。また、培養中枢神経細胞標本には多数のシナプス終末を同定することができます。私たちは、これらの標本における分泌小胞の動態を明らかにします。

（5）分泌標識急速凍結法

開口放出直後の小胞に標識物質を取り込ませた後、一定時間後に、急速凍結し電子顕微鏡によって観察する方法論を開発します。これにより、開口放出を律速する融合細孔の形態的同定や、小胞のリサイクルの様子を追跡します。

（6）レーザー標的分子不活性化

開口放出に関連することが予想されている多くの蛋白質に対して、レーザー標的分子不活性化法（Chromophore assisted laser inactivation, CALI）を行い、それに伴う機能的変化を直接測定します。その際、CALIによって起きる分子の変化と機能を対応させることにより、分子の機能の解明を試みます。

（7）光学的方法論による分泌の定量化

多光子励起法による、分泌組織の断層画像解析やカルシウム画像解析により臓器内での分泌現象を調べる道を開きます。また、光ピンセット法、エバネセント光やパルスレーザーによるケイジド試薬の閃光分解を試み、開口放出の新たな定量化の道を探ります。

3. 研究の体制

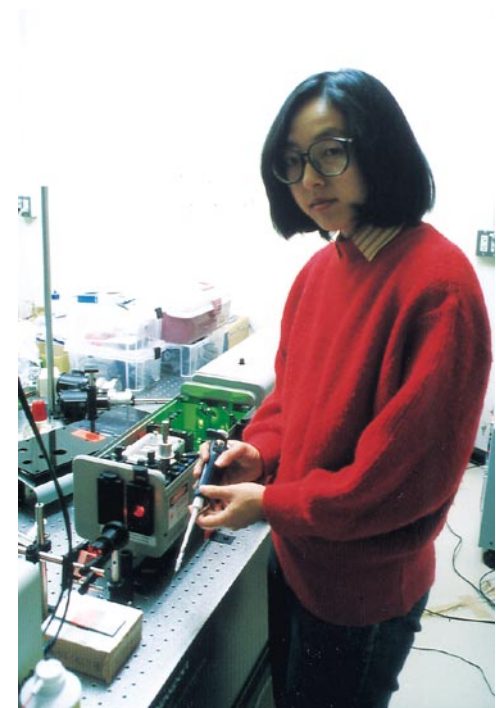
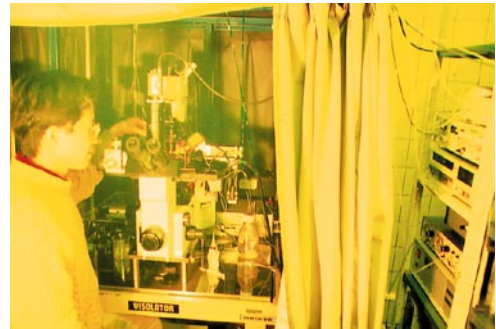
期 間：1996年10月～2001年3月

構 成：プロジェクトリーダー 1名

学術振興会研究員 2名（1名予定）

学術振興会特別研究員 1名 大学院生 9名 実験補助 5名

実施場所：東京大学医学系河西研



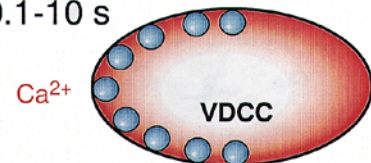
A 小型小胞

0.3 ms - 2 s



B 内分泌細胞 大型小胞

0.1 - 10 s



C 外分泌細胞 大型小胞

> 10 s

