

# 分泌におけるカルシウム・シグナリング

## Calcium Signaling in Secretion

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96L00301)

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. 研究目的

神経や分泌細胞の基本的機能である神経伝達物質やホルモンの分泌は、細胞内のカルシウムイオン濃度の上昇で調節されており、分泌は分泌顆粒の細胞膜への融合、即ち、開口放出(図2)によって起きる。しかし、カルシウム上昇がどうして開口放出を起こすのかはまだ根本的に不明である。

本研究では、新しい生物物理学的研究手法を用いて、また、異なる分泌細胞を比較する立場から、カルシウム依存性分泌を制御する機構の生理的、分子的、形態的理解を進めていくことを目的とした。

### 2. 研究成果概要

#### 2.1 細胞内カルシウム濃度の生理的範囲

現在まで、多くのカルシウム・シグナリングの研究は高親和性カルシウム指示薬を用いてなされており、生理的細胞内カルシウム濃度上昇は1マイクロモル以下であると考えられてきた。しかし、私達は低親和性カルシウム指示薬を用いたカルシウム画像処理を行い、外分泌細胞の様な上皮細胞でもカルシウム動員によって10μモル以上のカルシウム濃度上昇が起き、それによって、開口放出が起きるを見出した<sup>1,8)</sup>。同様な高いカルシウム濃度上昇は他の分泌細胞でも見出された<sup>2-6)</sup>。

更に、小脳プルキンエ細胞で同様なカルシウム画像処理を行ったところ、シナプス可塑性を誘発する反復脱分極によって、樹状突起のカルシウム濃度が10-50μモルにまで上昇することが明らかとなった。また、この際、大量の高親和性カルシウムバッファーが存在し、カルシウム応答をゲートしていることもわかった<sup>4)</sup>。

この様に、細胞内カルシウム濃度の生理的範囲は一般に0.1μモルから100μモルに及び、このことがカルシウムイオンが多く細胞機能を調節し得ることの基礎の一つとなっていると考えられる。開口放出や神経可塑性は、比較的高濃度のカルシウム要求性を示す細胞機能の代表である(図1)。

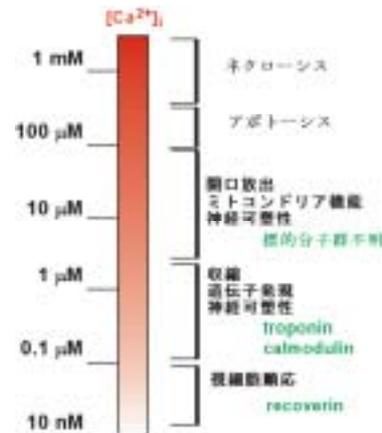


図1 細胞内カルシウム濃度とカルシウム依存性細胞機能

#### 2.2 開口放出し易さの多様性

細胞にケイジドカルシウム試薬を負荷し紫外線で閃光分解して高速カルシウム上昇を与えた時の、開口放出のミリ秒での測定を行うことにより(カルシウム濃度固定法)、開口放出のし易さ(速度定数)を直接測定することに初めて成功した。こうして、求められた速度定数は分泌小胞や細胞の種類によって著しく多様である事が初めて明らかとなった<sup>2,6)</sup>。これにより、開口放出の最終段階の速さ、即ち、開口放出し易さ(図2)が分泌機能を率速することがわかった<sup>6)</sup>。この多様性は小胞の分子的準備状態の多様性を表していると考えられ、開口放出の分子過程の解明の糸口となると考えられる。

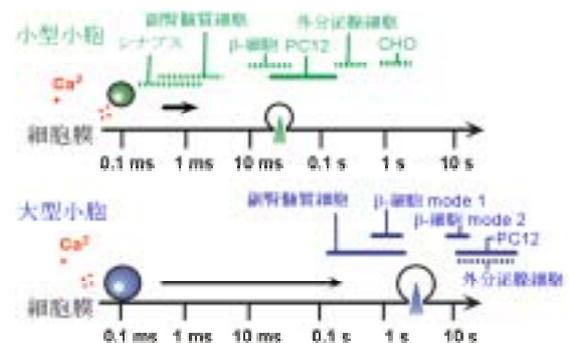


図2 開口放出し易さ(時定数)

### 2.3 2光子励起法による定量的神経・分泌細胞解析法の確立

2光子励起とは、フェムト秒の近赤外レーザーを対物レンズで集光することにより(図3b)、2つの光子が同時に分子に吸収され励起を起こす現象である(図3a)。2光子吸収は焦点面でのみ起きるので、焦点面以外での無駄な吸収がなく、深部到達性が高く、断層解像がある。従って、臓器標本における分子・細胞機構を調べるのに、最善の方法論である。

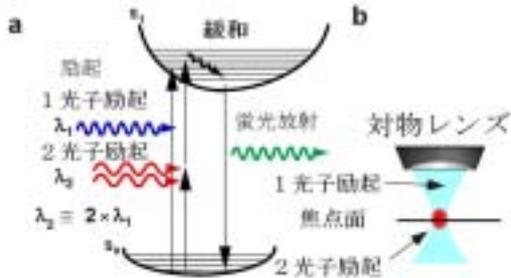


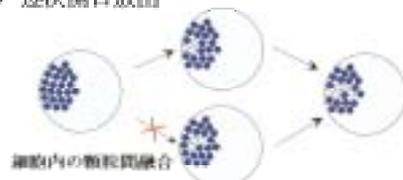
図3 2光子励起法

我々は、この方法論を分泌組織に適用することに初めて成功した。こうして、外分泌腺では、開口放出した小胞膜が安定に残存し、この小胞膜に対して二次的な開口放出が起きる(逐次開口放出、図4a)ことが明らかとなった。この小胞間の融合は、必ず細胞膜に開口放出し連続となった小胞に対して起きるので、細胞膜の融合因子があり、側方拡散で内部に供給されると考えられた<sup>8)</sup>。また、最外層顆粒の融合も内部の顆粒の融合も同じ時間で起きるので、内部の小胞の分子的分泌準備状態は最外部と変わらないことが示唆された。この機構では、小胞の動員に輸送が必要でなく、細胞の変形も最小限である(図4b)。この効率のよい分泌様式は内分泌細胞でも利用されていることがわかってきた。逐次開口放出は融合分子のダイナミックな供給を伴うので(図4c)開口放出の分子機構の解明に有力な現象である。

#### a 外分泌腺の開口放出像



#### b 逐次開口放出



#### c

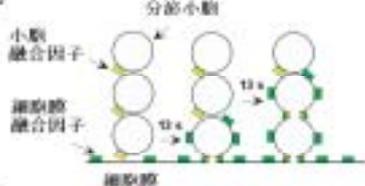


図4 外分泌腺の逐次開口放出

一方、2光子励起可能で安定なケイジドグルタミン酸の合成に成功し、光学的に高分解能で(1 μm以下)でグルタミン酸放出を起こすことを可能にした。これを海馬スライス標本に適用し、樹状突起スパイン形態とグルタミン酸感受性の強い相関を明らかにした<sup>9)</sup>。これは、大脳神経回路網の記憶が神経細胞の樹状突起の微細形態として蓄えられている可能性を示唆する。

### 3. 結論

本研究により、神経・分泌細胞機能の定量的特徴付けが著しく進んだ。特に、逐次開口放出現象が見出され、また、樹状突起スパインの形態・機能連関が明らかとなった。

### 4. 主な発表論文

- (1) Ito, K., Miyashita, Y. & Kasai, H. (1997) Micromolar and submicromolar  $Ca^{2+}$  spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells. *EMBO J.* 16: 242-251.
- (2) Ninomiya, A., Kishimoto, T., Miyashita, Y. & Kasai, H. (1997). Kinetic diversity in the fusion of exocytotic vesicles. *EMBO J.* 16, 929-934.
- (3) Takahashi, N., Kadowaki, T., Yazaki, Y., Ellis-Davies, G.C.R., Miyashita, Y. & Kasai, H. (1999). Post-priming actions of ATP on  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis in pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 760-765.
- (4) Maeda, H., Ellis-Davies, G.C.R., Ito, K., Miyashita, Y. & Kasai, H. (1999). Supralinear  $Ca^{2+}$  signaling by cooperative and mobile  $Ca^{2+}$  buffering in Purkinje neurons. *Neuron* 24, 989-1002.
- (5) Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y. & Kadowaki, T. (1999). Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283, 981-985.
- (6) Kasai, H. (1999). Comparative biology of  $Ca^{2+}$ -dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends Neurosci.* 22, 88-93.
- (7) Kishimoto, T., Liu, T., Ninomiya, Y., Takagi, H., Yoshioka, T., Ellis-Davies, G.C.R., Miyashita, Y. & Kasai, H. (2001). Ion selectivities of the  $Ca^{2+}$  sensors for exocytosis in rat pheochromocytoma cells. *J. Physiol. (Lond.)* 533, 627-637.
- (8) Nemoto, T., Kimura, R., Ito, K., Tachikawa, A., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. (2001). Sequential replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic acini. *Nature Cell Biol.* 3, 253-258.
- (9) Matsuzaki, M., G.C.R. Ellis-Davies, Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M. & Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptors expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* 4, 1086-1092.