



Water secretion associated with exocytosis in endocrine cells revealed by micro forcemetry and evanescent wave microscopy

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 坪井, 貴司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1189

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 336号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	坪井貴司		
論文題目	Water secretion associated with exocytosis in endocrine cells revealed by micro forcemetry and evanescent wave microscopy (エバネッセンス顕微鏡法と光ピンセット法によって示された内分泌細胞の開口放出に伴う水分泌)		

博士(医学) 坪井貴司

論文題目

Water secretion associated with exocytosis in endocrine cells revealed by micro forcemetry and evanescent wave microscopy

(エバネッセンス顕微鏡法と光ピンセット法によって示された内分泌細胞の開口放出に伴う水分泌)

論文の内容の要旨

[はじめに]

神経伝達物質やホルモンの分泌は、開口放出反応によって起こる。開口放出反応の際には、細胞質に存在する分泌顆粒が細胞膜と融合し、その内容物を細胞外へ放出する。しかし、実際に膜融合孔から内容物が放出される効率を決定する要因については、明らかになっていない。本研究では、分泌顆粒を蛍光染色し、細胞膜近傍のみを観察できるエバネッセンス顕微鏡下に、単一分泌顆粒の開口放出反応を可視化してその動態を解析した。また、開口放出反応時の内容物放出に伴う力学的変化を光ピンセット法によって計測し、解析した。この結果、内分泌または神経分泌においても細胞からの水の分泌が起こる、という知見を得た。

[方法]

観察には、初代培養したウシ副腎髄質クロマフィン細胞を用いた。培養2~5日後の細胞を、カテコールアミンに類似した色素であるアクリジンオレンジで染色して、分泌顆粒を蛍光化した。倒立顕微鏡を用い、YAGレーザー(532nm、50mW)のビームを高開口数対物レンズ(100倍、N.A.=1.65)の後側焦点面に収束、入射する方法によって、細胞を培養したガラス面上にエバネッセント光照明を実現した。エバネッセント光は約100nmの距離で急速に減衰するので、細胞膜を含む極めて薄い領域の蛍光画像が得られた。これをイメージインテンシファイヤー付きCCDカメラを用いて撮像し、分泌顆粒の蛍光強度変化の解析を行った。また、分泌されたカテコールアミンは、炭素線維電極を細胞膜に接着させ、酸化電流の変化としても定量した。倒立微分干渉顕微鏡を用い、Nd/YAGレーザー(1064nm、350mW)のビームをビームエキスパンダーで拡大後、対物レンズに入射させる方法によって、光ピンセットを構築した。焦点に直径1 μ mのラテックスビーズを捕捉し、細胞上1 μ mの距離に固定した。その可視光像をCCDカメラを用いて動画として捉え、明るさを解析することによって、z軸方向の動きを検出した。

[結果]

アクリジンオレンジを負荷した分泌顆粒は、エバネッセンス顕微鏡下で明るい蛍光輝点として観察された。刺激前の分泌顆粒の蛍光強度は、ほとんど変化しなかった。このことから、分泌顆粒は、すでに細胞膜に接着していることが示唆された。ガラス微小電極による刺激後30秒以内に、76 \pm 8%(平均値 \pm 標準偏差)の顆粒が消失した。しかし、細胞膜に接着している顆粒が刺激直後にすべて開口放出するわけではなく、刺激30秒後に反応するものや、まったく反応せずに、細胞質へと戻るものも観察された。顆粒の消失反応には2種類あり、主に、蛍光輝点が明るく広がってから消失する(フラッシュ型)反応が観察され、残りは蛍光輝点そのまま単に消失する(単純型)反応であった。また、炭素線維電極測定によって、フラッシュ型、単純型ともカテコールアミンの放出を伴うことが示され、これらの反応は開口放出

であることが分かった。

クロライドチャンネル阻害剤である4,4'-ジイソチオシアノスチルベン-2,2'-ジスルホン酸(DIDS、100 μ M)あるいは、5-ニトロ-2-(3-フェニルプロピルアミノ)-安息香酸(NPPB、100 μ M)を細胞に与えると、フラッシュ型反応が減少し、その単純型反応が増加した。また、ボツリヌス毒素C(1 μ M)を細胞外液に加えた場合、フラッシュ型も単純型も共に完全に抑制された。免疫蛍光染色の結果、分泌顆粒膜上にクロライドチャンネルが高い密度で分布することが分かった。また、光ピンセットにより捕捉したラテックスビーズが、開口放出反応に伴ってわずかに動くことが分かった。この動きは、クロライドチャンネル阻害剤によって抑制された。

[考察]

外分泌細胞では、管腔側膜上に存在する外向きの整流性クロライドチャンネルによって血管側から管腔側への水分分泌が起こる。しかし、内分泌細胞や神経細胞では、このような水分分泌の存在は考えられていなかった。本研究によって、クロライドチャンネル阻害剤を使うことにより、開口放出反応自体は抑制されないものの、放出様式が大きく変化することが分かった。また光ピンセット法によって、クロライドチャンネルに依存した微小な水分分泌が生じていることが分かった。これらから、内分泌細胞でも刺激に応じてクロライドチャンネルの活性化が起き、水分分泌が生ずること、また、このような水分分泌がカテコールアミンの急速な放出(フラッシュ型反応)を引き起こすことが証明された。

[結論]

エバネッセンス顕微鏡法と光ピンセット法により、開口放出反応時には、膜融合孔から短い水分分泌が起こることが分かった。この反応は、分泌顆粒膜上に分布するクロライドチャンネルの活性化によって引き起こされ、カテコールアミンの高速で効率的な放出を媒介している。

論文審査の結果の要旨

神経細胞や内分泌細胞からの神経伝達物質やホルモンの放出には、開口放出の機構が働いていることが分かっている。しかしながら、その分子動態と放出効率を決定する要因については、解明されていない。そこで申請者は、分泌顆粒をアクリジンオレンジで蛍光染色し、細胞膜近傍のみを観察できるエバネッセンス顕微鏡の下で、単一分泌顆粒の放出を可視化、解析した。また、微小ビーズをレーザー光で細胞近傍の溶液中に捕捉し、開口放出時の内容物放出に伴う力学的変化の測定も行った。

観察には、初代培養したウシ副腎髄質クロマフィン細胞を用いた。蛍光染色した分泌顆粒は、エバネッセンス顕微鏡下で明るい蛍光輝点として観察された。細胞を電気刺激すると、分泌顆粒が消失する反応が観察された。消失反応には2種類あり、主に蛍光輝点が明るく広がって消失するもの(フラッシュ型)と、蛍光輝点そのまま単純に消失するもの(単純型)があることが分かった。また、光ピンセットにより水中に捕捉した微小ビーズが、開口放出の際にわずかに遠のく方向へ動くことが分かった。

さらに、ClチャンネルとCa-activated Kチャンネルの開口放出反応への関与についても検討を加えた。Clチャンネルの阻害剤であるDIDSやNPPBを細胞に与えるとフラッシュ型が減少し、単純型が増加した。また、ビーズの動きも大きく抑制された。Ca-activated Kチャンネルの阻害剤であるカリブドトキシンを細胞に与えると単純型が増加する傾向にあった。免疫傾向染色の結果、分泌顆粒膜上に高密度でClチャンネル及び、

Ca-activated Kチャンネルが存在することが分かった。

以上のことから、開口放出反応時には、膜融合孔から水分泌が起こり、この反応は、分泌顆粒膜上に分布するC1チャンネル及びCa-activated Kチャンネルの活性化により引き起こされると示唆された。

審査委員会では、内分泌細胞でも外分泌細胞のように刺激に応じて水分泌が起こることを発見した点を高く評価した。上記のような申請者の論文の示説に対し次のような質問を行った。

- 1) エバネッセント光の性質について
- 2) 内分泌細胞にsyntaxin、synaptophysin等の膜融合蛋白が存在するのか
- 3) 分泌顆粒への水流入経路について
- 4) 分泌顆粒への水流入は開口放出前に起こるのか
- 5) パッチクランプ法で開口放出反応を測定できるのか
- 6) 開口放出反応におけるC1チャンネルの役割について
- 7) 抗C1C-3抗体以外にC1チャンネルの免疫染色で用いた抗体はあるのか
- 8) 開口放出時の分泌顆粒の直径は開口放出前と比べて大きくなっているのか
- 9) DIDSやNPPB以外のC1チャンネル阻害剤を用いた実験を行ったのか
- 10) 電荷のないホルモンなどを含む分泌顆粒内にも H^+ は蓄積しているのか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 高田 明和
副査 林 秀晴 副査 福田 敦夫