

学 位 論 文 題 名

ブタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネル

－サブタイプと脱分極による facilitation について－

学位論文内容の要旨

ブタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネルの性質を調べるために、培養細胞を用いて、whole-cell voltage clamp法によるカルシウムとバリウム電流の測定、高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応ならびにカテコールアミン放出反応の測定を行い、以下の成績を得た。

1. カルシウム電流の電位-電流関係からブタ副腎髄質細胞には高閾値型カルシウムチャネルのみが存在していることが明らかになった。このカルシウム電流は ω -conotoxin GVIA, nifedipineおよび ω -agatoxin IVAにより、程度に差はあったが、それぞれ濃度依存性に抑制された。最大濃度による抑制の割合はそれぞれ78%, 15%, 6%であった。また、これら3種の薬物を同一細胞に適用するとカルシウム電流は相加的に抑制された。
2. カルシウムチャネル抑制薬の存在下で1秒間の脱分極パルスを与えカルシウム電流の不活化の時間経過を観察したところ、 ω -conotoxin GVIA感受性の電流の方がnifedipineあるいは ω -agatoxin IVA感受性の電流より速く不活化した。
3. ω -Conotoxin GVIA ($1\ \mu\text{M}$)とnifedipine ($10\ \mu\text{M}$)は、高濃度カリウム刺激による細胞内カルシウム濃度上昇反応とカテコールアミン放出反応を約50%ずつ抑制したが、 ω -agatoxin IVA ($0.1\ \mu\text{M}$)は無効で

あった。ω-Conotoxin GVIAとnifedipineの併用により両反応はほとんど完全に抑制された。

4. 保持電位-80 mVから0 mVへのテストパルスに先行して、強い脱分極(+100 mV)パルス(プレパルス)を与えると、テストパルスによるバリウム電流の振幅は約1.2倍に増大した(バリウム電流の facilitation)。この facilitation はプレパルス電位の上昇(+20 mV以上)もしくは持続時間の延長にしたがって増大した。また、プレパルスとテストパルスの間隔の延長によって facilitation は減少した。
5. 細胞に8-Bromo-cAMP (1 mM)あるいはforskolin (10 μM)を適用するとバリウム電流の振幅は減少したが、プレパルスによるバリウム電流の facilitation には影響がなかった。また、細胞内のRp-cAMPSはバリウム電流の振幅、 facilitation とともに影響を与えなかった。
6. 細胞内にGTPγSを添加するとバリウム電流の振幅は減少したが、プレパルスにより増強されたバリウム電流の振幅はGTPγS非存在下と差がなかった。一方、GDPβSを添加するとバリウム電流の振幅は増大する傾向となったが、プレパルスにより増強されたバリウム電流の振幅はGDPβS非存在下と差がなかった。その結果、GTPγS存在下ではプレパルスによるバリウム電流の facilitation は大きく増大し、GDPβS存在下ではほぼ消失した。
7. GTPγSで抑制されたバリウム電流はω-conotoxin GVIAに感受性であったが、nifedipineには非感受性であった。また、プレパルスによるバリウム電流の facilitation はω-conotoxin GVIAによって消失したが、ω-agatoxin IVAおよびnifedipineでは影響されなかった。更に、Bay K 8644 (1 μM)はバリウム電流を約80%増大させたが、プレパルスによる facilitation には影響を与えなかった。

8. 細胞内にGTP γ Sを添加するとバリウム電流の活性化の遅延 (kinetic slowing)が生じた. このバリウム電流の活性化の遅延を ω -conotoxin GVIAおよび脱分極プレパルスは消失させた.
9. バリウム電流の振幅とプレパルスによるfacilitationは共に百日咳毒素では影響を受けなかったが, コレラ毒素はバリウム電流のfacilitationを増大させた.

以上の成績から, ブタ副腎髄質細胞には ω -conotoxin GVIA感受性のN型, nifedipine感受性のL型および ω -agatoxin IVA感受性のP/Q型チャネルが存在しており, 脱分極時の細胞内カルシウム濃度の上昇およびカテコールアミン放出には主にN型とL型のカルシウムチャネルが寄与していることが明らかになった. また, 脱分極プレパルスによるバリウム電流のfacilitationには主にN型カルシウムチャネルが関与しており, その機構は脱分極によりプロテインキナーゼAによるカルシウムチャネルのリン酸化が起こるのではなく, あらかじめかかっていたカルシウムチャネルのG蛋白による抑制が解除されることであることが示された. 更に, この機構にはG_iサブファミリーではなくG_sサブファミリーのG蛋白が関与している可能性が示された.

学位論文審査の要旨

主査	教授	中里幸和
副査	教授	斉藤昌之
副査	教授	葉原芳昭
副査	助教授	伊藤茂男

学位論文題名

ブタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネル

－サブタイプと脱分極による facilitation について－

1. ブタ副腎髄質細胞の電位依存性カルシウムチャネルの性質を調べるために、whole-cell voltage clamp法によるカルシウム（バリウム）電流の測定を行い、以下の成績を得た。

2. ブタ副腎髄質細胞のカルシウム電流は ω -conotoxin GVIA, nifedipineおよび ω -agatoxin IVAにより、それぞれ濃度依存性に抑制されたことから、少なくともN型、L型およびP/Q型の高閾値型カルシウムチャネルが存在していることが明らかになった。

3. 保持電位-80 mVから0 mVへのテストパルスに先行して、強い脱分極パルス（プレパルス）を与えると、テストパルスによるバリウム電流の振幅は約1.2倍に増大した（バリウム電流のfacilitation）。

4. 細胞に8-bromo-cAMP (1 mM)あるいはforskolin (10 μ M)を適用するとバリウム電流の振幅は減少したが、バリウム電流のfacilitationには影響がなかった。細胞内にGTP γ Sを添加するとバリウム電流の振幅は減少したが、プレパルスにより増強されたバリウム電流の振幅はGTP γ S非存在下と差がなかった。一方、細胞内にGDP β Sを添加するとバリウム電流の振幅は増大する傾向となったが、プレパルスにより増強されたバリウム電流の振幅はGDP β S非存在下と差がなかった。バリウム電流のfacilitationは ω -conotoxin GVIAによって消失したが、 ω -agatoxin IVAおよびnifedipineでは影響されなかった。

5. 以上の成績から、ブタ副腎髄質細胞には ω -conotoxin GVIA感受性のN型、nifedipine感受性のL型および ω -agatoxin IVA感受性のP/Q型チャネルが存在しており、脱分極プレパルスによるバリウム電流のfacilitationには主にN型カルシウムチャネルが関与しており、その機構は脱分極によりプロテインキナーゼAによるカルシウムチャネルのリン酸化が起こるのではなく、あらかじめかかっていたカルシウムチャネルのG蛋白による抑制が解除されることであることが示された。

これらの知見は、分泌細胞におけるカルシウムチャネルの多様性をさらに示したもの

であり、分泌生理学領域への貢献が大であると考えられる。よって審査委員一同、北村直樹氏は、博士（獣医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。