2P177

PC12細胞の開口放出に及ぼすミトコンドリア膜透過性変化の影響

○平木 啓子¹、服部 友裕¹、村井 健太郎¹、吉永 恵美子¹、井上 和秀²、太田 善浩¹ (¹農工大・工・生命工、²国立医薬品食品衛生研究所・薬理)

[目的] PC12細胞は、細胞外からのCa²⁺流入により開口放出を行うため、神経細胞のモデルとしてよく用いられる。神経細胞において、ミトコンドリアはCa²⁺を取り込むことにより細胞内Ca²⁺濃度の上昇を抑える働きをすると従来報告されてきた。一方で、ミトコンドリアは高濃度Ca²⁺にさらされることにより膜透過性変化(PT)を起こし、Ca²⁺を放出して細胞質Ca²⁺濃度を上昇させるという報告もある。そこで本研究では、細胞内Ca²⁺濃度上昇を引き金として起こる開口放出へのミトコンドリアPTの関与について調べた。

[方法] 本実験では、ラット副腎髄質褐色細胞腫より得られた神経系クローン細胞であるPC12細胞を用いた。PC12細胞にKC1を添加して細胞膜上の電位感受性Ca²⁺チャネルを開口させ、その際に起こる細胞内Ca²⁺濃度、NADH濃度、フラビンの還元状態、ミトコンドリア膜電位の変化を蛍光顕微鏡で測定した。ATP放出量を測定し開口放出の指標とした。

[結果] PC12細胞へのKC1添加により、細胞内Ca²⁺濃度の上昇と開口放出が確認された。細胞内Ca²⁺濃度上昇に伴い、NADH量の増加、フラビンの還元、ミトコンドリアの脱分極が観察されたため、細胞質で増加したCa²⁺がミトコンドリアに取り込まれていることがわかった。CCCPとオリゴマイシンを使ってミトコンドリアを部分的に脱分極させることで細胞質からのCa²⁺流入を抑えた場合、あるいはCsAによりPTを抑制した場合は、細胞内Ca²⁺濃度の上昇及び開口放出は抑えられた。これらの結果は、高濃度でCa²⁺を取り込んだミトコンドリアがPTを起こして細胞内にCa²⁺を放出することで開口放出を促進するという仮説を支持する。単離したミトコンドリアを用いてこの仮説を検討した結果も合わせて報告したい。

K.Hiraki, T.Hattori, K.Murai, E.Yoshinaga, K.Inoue and Y.Ohta : The effect of mitochondria permeability transition on exocytosis in PC12 cells

2P179

嗅粘膜スライス標本内における嗅細胞の活動電位特性

○今中 幸江¹、竹内 裕子¹、倉橋 隆^{1,2} (¹阪大院・基礎工・システム人間・生物工、²科学技術振興団(JST))

従来、嗅覚の電気生理学的研究においては、単離嗅細胞が実験試料として多く用いられて、過去10年ほどの間に多くの知見がもたらされた。しかし、単離標本では嗅細胞の持つ細い軸索(直径1μm以下)やシリア(直径2μm以下)が欠損し、さらに嗅上皮内での細胞の位置情報が欠けてしまう。生体に近い条件下での電気生理学的特性、形態を観察するため、今回我々はウシガエル嗅粘膜スライス標本を作製し、ホールセルパッチクランプ法を用いた。その際、パッチ電極内液に蛍光物質を溶解することでその細胞の形を観察した。

嗅細胞に電圧固定下で脱分極電圧刺激を行うと、電位依存性の一過性内向き電流と持続性外向き電流が観測され、これは単離嗅細胞でも観察された。また、電流固定下で、2~20pA、1秒間の電流注入を行うと、連続した活動電位が発生した。この活動電位について、スパイク振幅、注入電流、時間-周波数特性を解析した。発火周波数と注入電流の大きさの関係はミカエリスメンテンの式で近似できた。活動電位発生においては、非線形な増幅は見られなかった。

Y.Imanaka, H.Takeuchi and T.Kurahashi : Action potential generation of olfactory receptor cells in the slice preparation.

2P178

Caged化合物を用いた細胞内因子の自由制御：サブミクロンの嗅纖毛膜内cGMPをターゲットにして

○竹内 裕子¹、倉橋 隆^{1,2} (¹阪大・院基礎工・システム・生物、²科技団・PRESTO・JST)

単離嗅細胞をモデルにCaged cGMPを細胞内に導入し、光分解下でcGMPの分解特性によって生じる電流を指標に細胞内の酵素活性、分子の動向を検討した。Caged cGMPの時間依存性、光強度依存性を調べた。各々ヒルの式で一致し、両者のn値は近似していた(時間依存性: n = 4.0 ± 1.4, n = 17、光強度依存性: n = 5.0 ± 2.7, n = 19)。また、光強度を標準刺激の1/2、刺激時間を2倍にした時と、強度を1/3にし、時間を3倍にした時で、同じ大きさの応答が得られた。以上より、時間応答性、光強度応答性の相関は線形であることが示唆された。しかし、短時間刺激(200ms)と長時間刺激(5s)時とでは、異なる時間応答性が確認され、その立ち上がりを比較すると、短時間刺激は光強度-応答関係で予想されるnと一致した。すなわち、短時間刺激では細胞内cAMP濃度の線形増加を示唆している。一方、長い刺激では、理論値より実測値で立ち上がりの遅れが生じた。これは細胞内での順応の介入による。そこで、立ち上がりを保持電位-50mV、+100mVで比較すると、長時間刺激時と短時間刺激時ではHill係数に顕著な差が見られ、2連光刺激では、-50mVで刺激感覚時間を短くした時には順応が観察されたが、+100mVでは確認できなかった。今回の研究において、Caged化合物を用いて、細胞内cGMPを定量的に制御する系を確立し得た。更に、匂い受容カスケードを上流(R-G蛋白-AC)、下流部分(イオンチャネル部分)とに分けると、Cage化合物を用いる事で下流部分を制御でき、匂い物質と光物質との応答様式に相違が生じたことから、長時間刺激時には上流部分の修飾を受けていると示唆された。今後、この系を用いれば、今まで研究し難かった細胞内因子の解析や、時間経過に伴う順応機構も更に検討できよう。

H. Takeuchi and T. Kurahashi : Regulation of cytoplasmic cyclic nucleotide with caged substance in olfactory receptor cilium.

2P180

ATP添加による機械刺激応答感度の上昇

○河崎 綾、中岡 保夫(阪大院・基礎工学・生物工学)

多くの細胞で、機械刺激を加えると一過性の細胞内Ca²⁺濃度上昇が起き、それに続いて隣接する細胞でも細胞内Ca²⁺濃度が上昇しCa²⁺波となって伝播することが知られている。この一連の反応には刺激を受けた細胞からのATPの放出とG蛋白連結型のATP受容体(P2Y)の活性化が関与していることがわかってきている。我々は、P2Y受容体を発現しているラットグリオーマ細胞(C6 BU-1)に、先を丸くしたガラス棒を用いて機械刺激を与え、細胞内Ca²⁺濃度の変化を調べた。すると刺激後に一過性の細胞内Ca²⁺濃度上昇とまわりの細胞へのCa²⁺波の伝播がみられた。この反応は細胞外液のCa²⁺には依存しない(つまり細胞外液からのCa²⁺流入がなくてもおこる)ため、機械刺激時にはP2Y受容体からの伝達経路が活性化され、細胞内Ca²⁺ストアーからのCa²⁺放出が行われていることがわかる。またCa²⁺波の伝播は、ATP受容体阻害剤(Suramin)とホスホリパーゼC活性化阻害剤(U-73122)、ATPの放出口であるアニオンチャネルのブロッカー(NPPB)によってそれぞれ抑制された。さらに細胞外液のCa²⁺をなくすると、機械刺激を受けた細胞自身のCa²⁺応答も完全に抑制された。しかしながら、細胞からのATP放出を抑制し、かつ細胞外液のCa²⁺をなくした条件でも、あらかじめATPを細胞外にごく少量(1μM)加え細胞の興奮がおさまるのを待ったのちに機械刺激を行ったところ、機械刺激を受けた細胞のみに一過性の細胞内Ca²⁺濃度上昇がみられた。この結果は、細胞外にATPを加えると機械刺激に対する応答感度が上昇することを示すと考えられる。感度上昇がいかに引き起こされているのかを報告予定である。

A. Kawasaki and Y. Nakaoka : Sensitization to mechanical stimulation by the addition of ATP