

(18)

氏名(生年月日)	ナカ 中	タニ 谷	ケイ 敬
本籍			
学位の種類	医学博士		
学位授与の番号	乙第944号		
学位授与の日付	昭和63年6月17日		
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当(博士の学位論文提出者)		
学位論文題目	Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-activated conductance studied in a truncated rod outer segment of the toad (ヒキガエルの杆体外節分離標本を用いての cyclic GMP に依って活性化されるコンダクタンスの研究)		
論文審査委員	(主査) 教授 小山 生子 (副査) 教授 橋本 葉子, 教授 重田 帝子		

論文内容の要旨

目的

脊椎動物視細胞中に高濃度に存在する Guanosine 3',5' monophosphate (cGMP) は、光応答に関与する細胞内の信号伝達物質として、近年、従来の Ca イオンに代わって、最有力候補と見なされるに至った。この説を支持する幾つかの実験は、申請者中谷を含め、杆体外節膜の極く小片を用いて(所謂パッチクランプ法)行ったので、標本が生理的条件からかけ離れていること、外節内円板が混在する可能性のほか、幾つかの疑問点が残されている。本研究の目的は、上記の疑問点に答えるため、外節をできるだけ正常状態に近い構造を残した標本を考案して実験を行ない、cGMP が、細胞内信号伝達物質としての条件を満たし得るかどうかを検討することである。

方法

ヒキガエル (*Bufo marinus*) の単離杆体を、リングゲルを満たした微小ガラス管電極を用い、外節の末梢端から吸引し、外節のみを切り離し、外節内部が外液灌流液と接し、しかも光応答を示す標本を考案した。灌流液は細胞内液と類似の組成を持った人工溶液を用い、単離外節膜を OmV に固定し、外節膜を通して流れる微小電流を測定した。

結果

cGMP の分解酵素 Phosphodiesterase (PDE) の阻害剤 Isobutylmethylxanthine (IBMX) と、種々濃度

の cGMP を含んだ溶液を灌流すると、1. 内向き膜電流は、同一 cGMP 濃度では、灌流液が十分行きわたると考えられる $25\mu\text{m}$ 以下の標本では、外節の長さにはほぼ直線的に、 $4\sim 20\text{pA}\cdot\mu\text{m}^{-1}$ の範囲で増大し、2. 同一標本では、cGMP 濃度に応じて S 字状に増加し、約 1mM で飽和した。3. IBMX を加えない溶液では、低濃度の cGMP で起こる電流変化は極度に減少し、PDE で分解されない cGMP の同族体 (8bromo-cGMP) では IBMX の有無に拘らず作用した。4. IBMX の代わりに、GTP を加えると、cGMP に依って起こる膜電流の増加は光で抑制された。

考察と結論

以上の結果で、1. cGMP に依って開かれるチャンネルは、杆体外節膜上にはほぼ均一に分布し、ある範囲内で cGMP 分子の数に応じて開かれるチャンネル数は増加する。2. PDE は外節内部に存在する。3. このチャンネルは光照射にตอบสนองするチャンネルと同一である。4. cGMP の作用濃度から、暗時、開かれているチャンネルは、従来の値より低い 1% 程度と推定される。これらのことと、申請者の副論文で示したように、「光照射により細胞内 Ca イオン濃度が減少する」という知見から、外節中の cGMP を、信号伝達物質と想定することは正当であると、明確に結論できる。

論文審査の要旨

脊椎動物視細胞の光応答に関する従来の説は、視細胞膜は光照射により Ca^{2+} を遊離し、過分極になる。即ち、 Ca^{2+} が細胞内信号伝達物質として、膜の channel を閉じると信じられていた。しかし、本論文は、杆体外節膜の少片を用い、中谷らにより新しく確立された Truncated preparation 法並びに従来のパッチクランプ法により、微量な膜電流を正確に測定し、光による膜の過分極は、 Ca^{2+} によるものではなく、cGMP を細胞内信号伝達物質として用いその加水分解により引き起こされることを証明し、過去20年間の Ca^{2+} 説をくつがえした画期的な研究である。

主論文公表誌

Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-activated conductance studied in a truncated rod outer segment of the toad (ヒキガエルの杆体外節分離標本を用いての cyclic GMP に依って活性化されるコンダクタンスの研究)

Journal Physiology Vol. 395 731~753頁
(1988年)

副論文公表誌

- 1) Spatial properties of photoresponse and dark noise in rods (杆体における光応答の空間特性和暗雑音)
Biomed Res 3 (Suppl) 149~153 (1982)
- 2) GABA-mediated negative feedback from horizontal cells to cones in carp retina (コイ網膜における GABA によって中介される水平細胞から錐体への負のフィードバック)
Jpn J Physiol 32 (6) 911~926 (1982)
- 3) GABA-mediated negative feedback and color opponency in carp retina (GABA によって仲介される負のフィードバックと反対色)
Jpn J Physiol 32 (6) 927~935 (1982)
- 4) Cation selectivity of light-sensitive conductance in retinal rods (網膜杆体における光感受性コンダクタンスのカチオン選択性)
Nature 309 (5967) 352~354 (1984)
- 5) Electrogenic Na-Ca exchange in retinal rod outer segment (網膜杆体外節における電位発生的 Na-Ca 交換機構)
Nature 311 (5987) 661~663 (1984)
- 6) Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment (網膜杆体外節における、光によって引き起こされる細胞質遊離カルシウムの減少)
Nature 313 (6003) 579~582 (1985)
- 7) Light-suppressible, cyclic GMP-sensitive conductance in the plasma membrane of a truncated rod outer segment (杆体外節の切り取り標本における、光によって抑制可能な形質膜中のサイクリック GMP 感受性コンダクタンス)
Nature 317 (6034) 252~255 (1985)
- 8) Roles of calcium and cyclic GMP in visual transduction (光情報変換におけるカルシウムとサイクリック GMP の役割)
In Fortschritte der Zoologie 33: Membrane Control of Cellular Physiology. pp 343~366, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart · New York (1986)
- 9) Study of the roles of calcium and cyclic GMP in visual transduction (光情報変換におけるカルシウムとサイクリック GMP の役割についての研究)
Neurosci Res 6 (Suppl) S45~S54 (1987)
- 10) Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment (カエル杆体外節の形質膜を介するカルシウムマグネシウムの流れ)
J Physiol 395 695~729 (1988)