1PA105

バクテリオロドプシンのプロトン輸送反応機構
シッフ塩基のプロトン化・脱プロトン化
千葉大・薬 〇村田 克美, 畑 晶之, 星野 忠次, 津田 穰

【目的】バクテリオロドプシンの細胞外へのプロトン輸送は、光反応サイクルによって行われる。この中でも特にシッフ塩基を介したプロトン移動反応が起こる、L中間体からM中間体、およびM中間体からN中間体への反応過程に注目して、その反応メカニズムの詳細を量子化学的手法によって明らかにすることを目的とした。

【方法】反応系のモデルとして、Grigorieffらによる三次元構造モデル(PDB code:2BRD)を使用した。この構造モデルから、プロトン輸送反応に関与しているLys残基、レチナールおよびAsp残基を抜き出して、プロトン輸送のモデル反応系を構築した。この際、シッフ塩基とAsp残基の間に介在する水分子も考慮した。構造最適化及び最低エネルギー経路はHartree-Fock法による量子化学計算を行ない決定し、基底関数系には6-31G**を採用した。また、タンパク内部の環境を再現するために比誘電率を2.0とし、Onsagerモデルの球形空洞の半径は4.51 Åとした。計算プログラムにはGaussian94を使用した。

【結果・考察】シッフ塩基がプロトン化されている構造は、プロトンがAsp残基へ移っている構造よりも系のポテンシャルエネルギーが4.4kcal/molも高く、シッフ塩基は脱プロトン化された方がエネルギー的に安定であった。このことから、L中間体からM中間体への脱プロトン化反応は容易に進行すると言える。この結果は、誘電率を考慮しなかった場合(エネルギー差は33.6kcal/mol)と一致するが、そのエネルギー差は小さく、実験値(<1.5kcal/mol)に近いことがわかる。したがって、誘電率を考慮した場合の方がより正確なエネルギー評価がなされたといえる。

K.Murata,M.Hata,T.Hoshino,M.Tsuda : Mechanism of Proton Transport in Bacteriorhodopsin

1PA107

ミミズ巨大軸索情報伝達におけるミトコンドリアの関与
〇斎藤淳一, 清水亮作, 水谷賢史, 鈴木啓介, 小川宏人*, 谷下一夫, 岡浩太郎 (慶應義塾大学大学院理工学研究科, 慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科, *埼玉医科大学進学課程生物学教室)

ミミズ腹髄神経節内巨大軸索は逃避行動に関する情報伝達をおこなう神経細胞であり、頭側から入った信号を尾側に伝達することが知られている。神経細胞が情報を伝達するためにはアデノシン 3 リン酸(ATP)が必要であり、神経細胞に高頻度刺激が与えられた場合、情報伝達能力を維持するためにミトコンドリアはATPの供給量を増加させる必要があるものと思われる。そこで、ミミズ巨大軸索を高頻度に興奮させた際のミトコンドリアのATP産生変化をミトコンドリア膜電位を可視化することにより調べた。

巨大軸索内のミトコンドリア分布を調べるために、ミトコンドリアを特異的に染色する膜電位感受性色素ローダミン 123 (Rh-123)を巨大軸索に注入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。ミトコンドリア電子伝達系の脱共役剤であるFCCPを添加したところ、Rh-123の蛍光強度減少の大きい場所、巨大軸索細胞膜から約15 μm離れたところに、約10μm間隔で配列していることがわかった。この蛍光強度減少が大きい部位にミトコンドリアは存在していると考えた。

次に興奮電位伝播に伴うミトコンドリア膜電位変化を調べるために、巨大軸索に直接高頻度電気刺激を与え、同時にRh-123の蛍光強度変化を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その際、腹髄神経節尾側末端から伝播してきた興奮電位をサクション電極を用いて測定し、活動電位振幅と蛍光強度変化との関係調べた。

本研究の一部は日本学術振興会未来開拓学術研究推進事業および文部省学術フロンティア推進事業より援助頂いた。

J. Saito, R. Shimizu, K. Mizutani, K. Suzuki, H. Ogawa, K. Tanishita, K. Oka: Action potential propagation and mitochondrial activity in earthworm giant fiber.

1PA106

Neuro-2a 各部位におけるミトコンドリア膜電位の可視化解析
〇関口真理子、樋口美作子、太田善浩
東京農工大学、工学部、生命工学科

《目的》
Neuro-2a は神経芽細胞腫由来の細胞であり、カルシウムイオン(GM1 やCa²⁺)により神経細胞様に分化する。神経細胞は形態・機能ともに極性を持つため、ミトコンドリアの活動状態が細胞の部位により異なることが予想される。今まで行われた神経細胞を用いたミトコンドリア機能の研究ではミトコンドリア1個あたりの膜電位強度を比較したものではなかった。そこで本研究では、単位ミトコンドリアの膜電位強度を可視化解析することを目的とした。

《実験方法》
ミトコンドリア1個あたりの膜電位の大きさはテトラメチルローザシニエチル(THRE)とナリアクサシンナリツ(NAO)による二重染色、あるいはJC-1の蛍光のratio計測により行った。実験に用いる細胞は、実験前に予めミトコンドリアを可視化した実験皿に約1×10⁶cells づつ播種し、2日前にカルシウムイオン(GM1 とCa²⁺)を添加し分化させた。可視化解析は冷却 CCD カメラをコンピュータ制御して行った。

《実験結果》
Neuro-2a におけるミトコンドリアの分布は未分化のものでは均一に存在していたが、分化したものでは細胞体、突起の分岐点と先端に局在していることが分かった。THRE と NAO の 2 重染色の結果から GM1 で神経細胞様に分化した細胞ではミトコンドリア1個あたりの膜電位は細胞体では突起のそれより高いことを示した。また未分化の細胞では細胞全体でほぼ均一であった。さらに分化した細胞をマイクロ処理して細胞質の組成を均一にすると細胞体と突起でのミトコンドリア1個あたりの膜電位には差がなくなった。

またJC-1の実験ではモノマーは比較的早く細胞質全体を染色するが、アグリーゲイトは細胞体部分を染色するのに時間を要することが分かった。現在はJC-1に関しては、最適染色条件の決定最中である。

M.Sekiguchi,M.Higuchi,Y.Ohta : Visualization of mitochondrial membrane potential in Neuro-2a

1PA108

ミミズの這行および逃避行動時における細胞外電位測定
〇水谷賢史¹, 鈴木啓介¹, 清水亮作¹, 斎藤淳一¹, 北村美一郎¹, 小川宏人², 谷下一夫¹, 岡浩太郎¹
(¹慶大・理工・システムデザイン工学, ²埼玉医大・生物)

ミミズの腹髄神経節は腹側皮膚直下に存在し、自律分散的に行動の制御を行っている。ミミズは縦走筋と環状筋を協調して動かすことで這うように前進する。また外部から刺激を受けるとからだ全体を収縮させて逃避を行う。我々は細胞外電位を非侵襲的に誘導し、その電位から筋の活動成分を抽出して行動と対応させることを試みた。

体壁に評点を打ったミミズの行動をビデオに撮り、部位ごとの移動距離、移動速度、移動加速度を得た。次に2本1対の銀線3対をミミズの頭、中央、尾に位置する部位に枕木状に配列し、この上でミミズを這行させた。刺激装置により制御された発光ダイオードの点滅をビデオフレーム中におさめることで行動と細胞外電位を同期させて記録した。またミミズ頭部に刺激を与えた際の逃避行動についても調べた。

這行時の細胞外電位に現れる高振幅振動域は頭部に位置する電極から尾部に位置する電極に向けて速度 30 mm/sec で移動した。この速度はミミズの這行速度に一致した。逃避時の高振幅振動域は頭、中央、尾部で刺激入力と同期して見られた。またミミズの径変化を測定したところ、這行時の高振幅振動域は径の収縮に同期し、逃避時には同期していないことが分かった。高振幅振動域では10～30 Hzの周波数成分の有意な増加が見られた。これは一般に考えられている筋の電位の周波数に一致している。

本研究の一部は日本学術振興会未来開拓学術推進事業及び文部省学術フロンティア推進事業より援助頂いた。

K. Mizutani, M. Kitamura, K. Suzuki, R. Simizu, J. Saito, H. Ogawa, K. Tanisita, K. Oka : ANALYSIS OF EARTHWORM BEHAVIOR WITH SIMULTANEOUS RECORDINGS OF MOTION AND EXTRACELLULAR FIELD POTENTIAL