1PD053

蛍光色素を用いた単一ミトコンドリアを対象とする膜電位計測法の開発
○中山 智、太田 善浩
東京農工大学大学院 工学研究科 生命工学専攻

〔目的〕本研究では、細胞より単離した個々のミトコンドリアにおける膜電位の時間変化に対応できる膜電位計測法を新たに開発することを目的とした。

細胞の内外を問わずミトコンドリアの膜電位は1個1個を見るとダイナミックな経時変化を示すことが最近わかった。しかし、蛍光色素を用いてこのような膜電位変化をmV単位に換算する技術はない。そこで、ミトコンドリアにおけるATP合成機構をより明らかにするために膜電位を反映した色素の蛍光強度変化をmV単位に換算する技術の開発を目指した。これは膜電位の維持機構を理解する上で極めて大切である。

〔方法〕ブタ心筋細胞から単離したミトコンドリアを用い、これをコーティング剤によりガラス皿に固定した。そして、膜電位感受性色素であるTMREでミトコンドリアを標識することで個々のミトコンドリアから発せられるこの色素の蛍光をCCDカメラで検出してその時間変化を測定した。ミトコンドリア内外でKClの濃度勾配を人為的につくり、K⁺のイオノフォアであるバリノマイシンを加えた。膜電位の形成はこのミトコンドリア内外のK⁺が拡散することで生じる電位差によるものとした。バリノマイシン存在下では、この膜電位をKCl濃度比をもとにネルンストの式から求めることができる。そして、KCl濃度比とこの時発せられる蛍光色素の蛍光強度の関係をグラフにし、膜電位の検量線を作成した。

〔結果及び考察〕バリノマイシンを添加させ、ミトコンドリアに作用する過程を観測したところ、添加後色素の蛍光強度が素早く上昇した。従って、個々のミトコンドリアにおいてバリノマイシンとK⁺を組み合わせることで人間的にミトコンドリア膜電位を形成させることができたと言える。しかし、一旦は上昇するものの徐々に減少し、安定した輝度を得られなかった。そこで、添加後に生じるピークの最大値をとり、これを膜電位を反映する色素の蛍光強度とした。ミトコンドリア外部のKCl濃度を増大させ、膜電位の大きさを変化させるとミトコンドリア内部の色素の蛍光強度も上昇した。しかし、現在得られている検量線は理論上予想されるものと異なっており、その原因については現在検討中である。

Satoshi Nakayama, Yoshihiro Ohta : Calibration of fluorescence changes sensitive to mitochondrial membrane potential

1PD055

膵臓房細胞単離小胞体標本における FK506 感受性
Ca²⁺放出の特性
○小澤輝高 (東北大・医・生理)

免疫抑制剤の FK506 は骨格筋の筋小胞体において、リアノジン感受性 Ca²⁺チャネル(受容体)に結合している、FK506 結合蛋白質を受容体から解離することにより、チャネルの機能を修飾することが知られている。今回、ラット膵臓房細胞の単離小胞体標本からの Ca²⁺放出に対する、FK506 の効果を検討した。

単離小胞体標本中に ⁴⁵Ca²⁺を、Ca²⁺-pump の働きで取り込ませた後、FK506 (0.1~200 μM) を投与すると、図 1 に示す様に、用量依存性でしかも二相性の ⁴⁵Ca²⁺放出が見られた。10 μM 以下で見られる、第一相を Lineweaver-Burk plot で解析すると、K_{1m} は 0.5 μM、V_{1max} は 8.1% となった。また第一相での ⁴⁵Ca²⁺放出は、cyclic ADP-ribose (cADPR: 0.5 μM) 存在下に促進され、V_{1max} は 14% となった。更に、caffeine (5~10mM) や cADPR (2 μM) による ⁴⁵Ca²⁺放出は FK506 (3 μM) 存在下に有意に促進された。以上の結果より、第一相による Ca²⁺放出は、caffeine や cADPR で活性化される、リアノジン感受性 Ca²⁺放出機構を介するものと考えられる。次に、10 μM よりも高い濃度で見られる第二相を Hill plot で解析すると、Hill 係数 n は 3.0、K_{2max} は 55 μM、V_{2max} は 60% となった。第二相による Ca²⁺放出が、caffeine 感受性を有するかどうかを調べるために、100 μM の FK506 により、40~50% の ⁴⁵Ca²⁺を放出させた後、caffeine (30mM) を投与した所、更に 20% 程度の ⁴⁵Ca²⁺放出が見られた。このことから、第二相による Ca²⁺放出は、caffeine に対して非感受性と考えられる。

図 1 FK506 の用量応答曲線

T. Ozawa: Characterization of FK506-sensitive Ca²⁺ release from pancreatic microsomes.

1PD054

開確率の異なる type1 リアノジン受容体に対する酸化・還元剤とチャネル賦活剤の効果
○大羽利治、村山尚、小川靖男 (名古屋市立大・医・第一生理、順天堂大・医・薬理)

type1 リアノジン受容体のチャネル活性は少なくとも二種類の Ca²⁺依存性(high-Po, low-Po channel)を示す。この性質はチャネル蛋白質の酸化・還元状態による可能性が高いらしい (Marengo, J.J. et al., 1998; Murayama, T. et al., 1999)。本研究ではこの可能性を詳細に、また、high-Po と low-Po channel がチャネル賦活剤に対し異なる作用を示すか否かを検討した。ウサギ骨格筋から精製した FKBP12 を欠く type1 リアノジン受容体を lipid bilayers に組み込み、-40mV (cis) の holding potential に電位固定、チャネル電流を測定した。high-Po channel 活性は SH 還元剤 (dithiothreitol) で、low-Po channel 活性は SH 酸化剤 (pCMPS) で濃度依存性(1 μM~1mM)に抑制、及び賦活化された。酸化・還元剤処置チャネルはいずれも Ca²⁺依存性を保持し、チャネル conductance は変化せず、ryanodine、ruthenium red に対し応答した。low-Po channel への pCMPS 処置での賦活化は、似た開確率を持つ high-Po channel と比較から、大きな時定数を持つチャネルの開状態の出現に依った。閉時間は両者で似ていた。一方、high-Po channel と異なり、low-Po channel は adenine nucleotide (ATP, AMPPCP)、caffeine に対し、低感受性を示した。以上の結果は type1 リアノジン受容体の酸化・還元状態が Ca²⁺や他の賦活剤の応答を修飾していることを示唆している。

T. Oba, T. Murayama, Y. Ogawa: Effects of redox reagents and Ca²⁺-release channel modulators on type 1 ryanodine receptor with different channel opening probability.

1PD056

連結輸送の回路網理論

大阪医大 今井雄介

1 次能動輸送、2 次能動輸送、体積-溶質連結流や熱浸透現象を一般化して連結輸送と呼ぶ。輸送現象は有効エネルギーを消費してエントロピーを生成する散逸過程である。膜輸送での有効エネルギーの流 (パワー) を流 J とそれに共役する駆動力 X の積で表現すると、流入パワーの総和は散逸と釣り合う (式1)。受動輸送は各々の成分 i の流入パワーがそのまま散逸する (式2)。流と駆動力の関係は抵抗体 R_i 上のオーム則で表現できる (式3)。

$$\sum_i J_i X_i = \Phi \quad (1)$$

$$J_i X_i = \Phi_i \quad (2)$$

$$J_i = X_i / R_i \quad (3), J_A^p = X_A / R_A \text{ and } J_B^p = X_B / R_B \quad (4)$$

連結輸送は一方 k で消失し他方 i に現れる保存的なパワー変換伝達過程 (V_{ik}; 式5) とパワー散逸過程を含む複合過程である。

$$V_{ik} = X_k \gamma_{ik} \quad (5) \quad \gamma_{ik} \text{ は変換体の変換率}$$

A および B の 2 種類のパワー連結は、2 つの変換伝達過程と 1 つの散逸過程で回路化できる。すなわち A, B の力変数は各々変換率 γ_A, γ_B を持つ変換体を介して C 種の力変数に変換され、抵抗体 R_C 上の C 種のパワー散逸過程となる (式6)。

$$J_C = (\gamma_A X_A + \gamma_B X_B) / R_C = X_C / R_C \quad (6)$$

連結回路に A, B の受動輸送 (式4) を表現する抵抗体を並列に接続することで全輸送回路が完成する。全回路から交叉係数の等しい現象論方程式 (式7) を導くことができ、膜輸送式となる。

$$\begin{aligned} J_A &= J_A^p + \gamma_A J_C = X_A / R_A + \gamma_A (\gamma_A X_A + \gamma_B X_B) / R_C \\ &= X_A (1/R_A + \gamma_A^2 / R_C) + \gamma_A \gamma_B X_B / R_C \\ J_B &= J_B^p + \gamma_B J_C = X_B / R_B + \gamma_B (\gamma_A X_A + \gamma_B X_B) / R_C \\ &= \gamma_B \gamma_A X_A / R_C + X_B (1/R_B + \gamma_B^2 / R_C) \end{aligned} \quad (7)$$

この時、パワー釣合は次になる。

$$J_A X_A + J_B X_B - J_C X_C + J_C X_C = \Phi_A + \Phi_B + \Phi_C \quad (8)$$

Y. Imai : Network theory of coupled transport