3K0900

チャネルポアの3次元構造に基づく「水の効果」の検討

○久木田 文夫（岡崎機構・生理研・生体膜）

神経線維膜の膜電位依存性イオンチャネルは溶液に非電解質を加えると機能の時間経過が緩やかになるが、時間軸が変化するのみで神経線維の基本的な機能（活動電位の発生・伝搬や膜電位依存性など）は全体としては変わらない。この現象は人為的に溶液の水の性質を変えたことに由来するが、このいわゆる「水の効果」抜きでは神経活動の時間経過は記述できない。この現象は電位センサーに対する粘性効果とポアに対する浸透圧効果の総和で説明できる。粘性効果は電位センサー及びその周りの環境がゆらぎの大きな構造をもつことで説明できる。一方で浸透圧効果は親水性ポアが存在を抜きにしては理解できない。

チャネルポアに対する浸透圧効果をより視覚的に理解するため、Kチャネルポアとミトコンドリアのポーリンの3次元構造のデータを用いて定性的な解析を行った。非電解質や水がポアのどの部分まで入り込むか調べ、浸透圧効果の分子的な機構を考察する。更に、神経膜の膜電位依存性イオンチャネルとポーリン（膜電位依存性陰イオンチャネル）の浸透圧効果の質的及び量的な違いを構造をもとに説明することを試みた。実験データとしては膜電位依存性Naチャネルのデータに加え、膜電位依存性Kチャネルのデータも合わせて検討した。

Kチャネルポア構造から求めたポア内に入りうる水は、浸透圧効果により求められる非電解質が入らないスペースよりも一桁大きい。これはポアの一部の構造変化がポアの閉過程にとっては意味があることを示している。浸透圧効果の顕著なポーリンの場合と比較して、検討を進めると、膜電位依存性イオンチャネル（NaチャネルやKチャネル）に対する水の効果とポーリンに対する水の効果の定性的な違い（水の効果の膜電位依存性など）を、両チャネルの構造に違いから説明できる。

F.Kukita : Analysis of water effects on voltage-dependent ion channels relating with a 3-D structure of channel pore.

3K0930

芳香物質によるイオンチャネル型GABA受容体の活性化の機構

○青島 均¹, 濱本 康太郎¹, Hossain Sheikh J.¹, 新貝 錦蔵² (¹山口大・理・自然情報, ²岩手大・工・情報)

イオンチャネル型のGABA受容体は抑制性で、様々な物質、ベンゾジアゼピン、バルビツール酸、神経ステロイド、エタノール、麻酔薬などにより活性化され、鎮静作用、抗不安作用、抗不眠作用、麻酔作用を示す。クローニングされた受容体サブユニットのcDNAからcRNAを合成し、アフリカツメガエル卵母細胞に注入してこの受容体を発現させ電気応答を測定した。この受容体は物質の官能基や鎖長に強く依存して活性化された。またアロマセラピーに用いられている精油成分や森林で発散されるフィトンチッド成分によっても活性化されることを見出した。これらの結果を、芳香物質が活性化部位に結合するとGABAのGABA受容体への結合力が増大するという簡単なモデルを用いて解析した。森林浴やアロマセラピーの心に安らぎをもたらす効果は、芳香物質が血液に取り込まれ脳内に入って直接GABA受容体を活性化することから生じる可能性が考えられる。本研究の一部は財団法人三栄源食品化学研究振興財団および社団法人京都府茶業会議所からの研究助成を受けましたので深謝いたします。

H. Aoshima, K. Hamamoto, S. J. Hossain, R. Shingai : Activation of ionotropic GABA receptor by fragrant compounds

3K0915

ヤリイカ電位依存性カルシウム・チャネル α 1サブユニットと β サブユニット

○木村 忠史、久保 泰（工技院・生命研）

電位依存性カルシウム・チャネル（VDCC）は、 α 1、 β 、 α 2/ δ 、 γ サブユニットなどから構成されており、 α 1サブユニットがイオンを透過させるポアを形成する。VDCC β サブユニットは、現在までに β 1 $\sim\beta$ 4の4種類といくつかのバリエーションが知られており、VDCC α 1サブユニットとの組み合わせにより特徴的な電流特性を示すことが知られている。SqCa_v2はヤリイカ視葉よりクローニングされたVDCC α 1サブユニットである。アミノ酸配列の相同性比較から哺乳類VDCCのCa_v2のグループ（Ca_v2.1（ α 1A）、Ca_v2.2（ α 1B）、Ca_v2.3（ α 1E））に属すると考えられており、現在その電気生理学的薬理学的解析が進められているところである。我々は、その過程でヤリイカVDCC β サブユニットである β sqをクローニングしてきた。今回、SqCa_v2の発現する電流に対する哺乳類 β 1b、 β 2a、 β 3、 β 4、とヤリイカ β sqの機能の比較検討をアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用い、2本電極電位固定法にて行ったので報告する。SqCa_v2の示す電流は、最大に達した後あまり不活性化しない。 β sqを共発現させたSqCa_v2の示す電流もまたあまり不活性化しなかった。哺乳類 β サブユニットのうち β 1b、 β 3、 β 4を共発現させたSqCa_v2の示す電流は、電流が最大に達した後不活性化が認められた。 β 2aを共発現させたSqCa_v2の示す電流はあまり不活性化が認められなかった。これら哺乳類 β サブユニットのSqCa_v2の不活性化への影響は、哺乳類VDCC（Ca_v1.2（ α 1C）、Ca_v2.1（ α 1A）、Ca_v2.3（ α 1E））で報告されている、 β 3 $\approx\beta$ 1b $>\beta$ 4 $>\beta$ 2aの順で不活性化への影響が強い、というものとほぼ一致するものである。

T. Kimura and T. Kubo : Squid voltage-dependent calcium channel α 1 subunit and β subunit

3K0945

イオンチャネルの1分子イメージング

○井出 徹¹, 坂本 裕人¹, 柳田 敏雄^{1,2} (¹ 科学技術振興事業団・1分子過程プロジェクト, ² 大阪大学・医)

昨年に引き続き、イオンチャネルの構造変化と電流揺らぎを同時に計測出来る実験系の開発を行っている。蛍光ラベルしたイオンチャネル1分子による蛍光揺らぎと、電流揺らぎを同時に計測することにより、ゲーティングの分子実体を解明することが目標である。予備実験として、電位固定した人工膜上での単一脂質分子の熱運動を計測した。蛍光ラベルした脂質を含む人工脂質二重層膜を、ポリプロピレンシートにかけた小孔（直径約100 μ m）に形成し、その蛍光像をICCDカメラで観察した。脂質膜は、アガロースコートしたガラス表面に接触させた状態で保持し、エバネッセント照明による観察を可能にした。膜電位は、パッチクランプアンプにより固定した。上記人工膜は、膜電位 $\pm$ 100mVの範囲で、電氣的に安定であった。脂質分子1分子の軌跡から求めた拡散定数（ $D=8.5 \pm 4.9 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$ ）は、FRAP等の巨視的な方法で求めた値とよく一致し、脂質分子は人工膜上を自由に拡散しているものと思われる。次に、蛍光ラベルしたチャネル形成ペプチド（Cy3-alamethicin）を人工膜に組み込み、同時計測を行った。ゆっくり（ $D=4.0 \pm 1.6 \times 10^{-8} \text{cm}^2/\text{s}$ ）と熱運動する輝点が観察され、同時に、膜を介して流れる電流が単一チャネルレベルで観測された。輝点は、多段階を経て消光することから、アラメチシン分子が、膜中で多量体をつくり、チャネルを形成しているものと思われる。また、人工膜にベシクル融合を用いて、チャネルタンパクを組み込むことも可能で、この膜を用いて、電気器官のACh受容体チャネル、骨格筋のMaxi-Kチャネル等を介した電流が、単一チャネルレベルで測定可能であった。

T. Ide, H. Sakamoto and T. Yanagida : Single molecule imaging of an ion-channel