3K1000

7と18番目をグルタミン酸で置換したアラメチシンのイオンチャンネル：シングル・チャンネル電流のpH依存性

○浅見 耕司¹、岡崎 敬¹、永井 康晃¹、長岡 康夫²（¹京大・化研、²京大・院薬）

イオンチャンネルの構造と機能の相関を検討する上で、低分子量のペプチドが脂質二分子膜に形成するイオンチャンネルは良いモデルとなる。特に、アラメチシンは生体のイオンチャンネルと似た“ヘリックス・バンドル”型のチャンネル構造をつくるため、生体のチャンネルモデルとして有用である。最近、異常アミノ酸（アミノイン酪酸）を多く含むアラメチシンの固相合成法が確立され、アミノ酸残基を置換してチャンネルの機能を容易に調べることができるようになった。今回の発表では、チャンネルの形成やイオン透過に重要な役割を持っていると考えられている7、18番目の親水性残基をグルタミン酸に置換して、グルタミン酸の解離とチャンネル形成、イオン透過、イオン選択性の関係について調べた結果を報告する。単一チャンネル電流の測定は平面脂質二分子膜を用いてを行った。電解質水溶液のpHを変えることによってグルタミン酸の解離を進めると、ペプチドの会合数が増えるチャンネルが増加し、また、同じ会合数のチャンネルと比較すると、コンダクタンスが増えると共に、強いカチオン選択性を示すようになる。このグルタミン酸の解離によるイオン透過の増加とカチオン選択性を考察するために、イオン透過の簡単なシミュレーションを行った。イオン透過に対するチャンネル内のポテンシャル・エネルギーのプロファイルをfinite-difference Poisson-Boltzmann (FDPB)法で求め、このプロファイルからNernst-Planck式を用いて、チャンネル電流と電圧の関係を計算した。

K. Asami, T. Okazaki, Y. Nagai and Y. Nagaoka : Modification of electrical properties of alamethicin ion-channels by substitution of Glu for Gln at position 7 and 18

3K1030

ミトコンドリア膜透過性変化に及ぼすCa²⁺の影響

○服部 友裕、渡辺 功一、太田 善浩（東京農工大学・工学部・生命工学科）

【目的】

酸化的リン酸化を経てATPを合成する細胞小器官ミトコンドリアには、蛋白質複合体により形成されたPermeability Transition Pore（以下PTP）と呼ばれるチャネルが存在している事が知られており、PTPが開いて細胞内のカルシウム信号を増幅したり、細胞死を引き起こしたりすると考えられている。PTPを開かせる要因の一つとしてCa²⁺が知られているが、そのメカニズムは不明である。

そこで、本研究では、PTPの開閉に対してCa²⁺がどのように影響するのか単一ミトコンドリアで調べた。

【実験操作】

実験では単離したブタ心筋ミトコンドリアを用い、蛍光顕微鏡によりCa²⁺存在下・非存在下において単一のミトコンドリアの膜電位を測定した。

操作は次の手順で行った。カバーガラスにミトコンドリアを貼り付け、これを膜電位感受性色素TMREで染色し、測定開始後に、NADHの合成とそれに続く電子伝達系の反応を引き起こすTCAサイクルの基質であるリンゴ酸を系に添加して、その後のミトコンドリア膜電位の変動を観察した。

【結果】

Ca²⁺存在下・非存在下ともにリンゴ酸添加によるミトコンドリアの分極が観察され、その後脱分極・分極を繰り返した。その頻度はCa²⁺濃度依存的に増加した。この現象はCa²⁺が存在することによりPTPが開きやすくなることを示している。その原因としては、Ca²⁺がミトコンドリア内に取り込まれる事により電子伝達鎖が活性化されたため、もしくは、Ca²⁺がPTPのCa²⁺結合部位に結合したためによるものと考えられる。

T.Hattori,K.Watanabe,Y.Ohta : The effects of Ca²⁺ on mitochondrial permeability transition

3K1015

単一ミトコンドリアのイメージングによるミトコンドリア膜透過性変化機構の研究

○渡辺 功一、中山 智、大鷲 笑子、太田 善浩（農工大・工・生命工）

背景）近年ミトコンドリアにはPermeability Transition Poreと呼ばれる蛋白質複合体からなるチャネルが存在し、その開閉による内膜の透過性変化が、アポトーシスや細胞内カルシウムシグナル伝達に関与するという報告がある。そのためアポトーシスなどの現象を理解するためには、膜透過性変化の調節機構を調べる必要があると考えられている。この変化は、ミトコンドリア内膜を隔てたイオン勾配である膜電位を観察することで調べることができる。なぜならミトコンドリア内膜のイオン勾配が解消するほどの膜透過性変化は、膜電位の消失として観察できるからである。本研究では、単一ミトコンドリアで膜電位の経時変化を測定して、ミトコンドリア内膜の透過性変化の詳細を調べた。

方法）内膜の膜電位を単一ミトコンドリアで測定することにより、内膜の透過性変化を検出した。豚心筋から単離したミトコンドリアをカバーガラスに吸着させ一箇一箇観察できるようにした。膜電位を調べるために、ミトコンドリアを膜電位感受性蛍光色素TMREで染色し蛍光強度変化を時間分解計測した。

結果）リンゴ酸を添加してミトコンドリアのNADH合成反応を促進させると、基質添加直後に膜電位が形成され、その後、膜電位の消失と形成を繰り返した。この膜電位の急激な消失は、Permeability transition(PT)に対する阻害剤であるBongkrekic AcidやADPで抑えられた。また、リンゴ酸濃度の上昇が膜電位の急激な消失を起こす頻度を上昇させる一方でロテノン添加は、膜電位の急激な消失を著しく抑えた。

結論）ミトコンドリアは呼吸の際に内膜の透過性を大きく繰り返し変化させている。この膜透過性の大きな変化は今までPTとして知られてきた現象であり、電子伝達系に電子が流れることが原因で生じる。

K.Watanabe,S.Nakayama,E.Oowashi,Y.Ohta : Analysis of mitochondrial permeability transition in single mitochondrion with fluorescence microscopy

3K1045

疎水性イオンチャネルのイオン選択性における水-イオン相互作用の意義

○威 智¹、曽我部 正博^{1,2}（¹名古屋大学 医学部 第二生理、²科学技術振興事業団 国際共同研究「細胞力覚プロジェクト」）

Ion selectivity of the channel protein is critical for its function. However, its mechanism is still not fully understood due to involvement of complicated interactions during selection process. Roughly, these interactions could be divided into three categories: ion-water, ion-channel and water-channel interactions. Previously, we have performed electrophysiological analysis (1) and molecular dynamics (MD) simulations (2,3), on a de novo synthetic hydrophobic ion channel. In the present study, MD simulations were carried out to evaluate the contribution of ion-water interaction to the selectivity because the hydrophobicity of the channel makes the contribution of the ion-channel and water-channel interactions negligible. The obtained potential energy profiles of the ions across the channel could account for the selectivity sequence, K+ ≻ Na+ ≻ Li+, observed in the experiment. Detailed analysis of the interaction energy in the channel demonstrated that the selectivity sequence is mainly due to the difference between the ion-water interaction energy at the narrowest part of the channel and that in the bulk solution. Present study may help us understand ion selectivity mechanism of natural channels because a channel filled with water is a prerequisite for the ion permeation across the channel.(1)Qi, Z., M. Sokabe, K. Donowaki, and H. Ishida. (1999). Biophys. J. 76:631-641.(2)Qi, Z., M. Sokabe. (1998). Biophys. Chem. 71:35-50.(3)Qi, Z., M. Sokabe. (1999). Biophys. Chem. 82:183-193

Z. Qi and M. Sokabe : Significant Contribution of Ion-water Interaction to the Ion Selectivity of a de novo Synthesized Hydrophobic Channel