3P221

Kチャンネル不活性化機構に関与する細胞外イオン結合サイトの解析

○清水 啓史、山田 克幸、老木 成稔（福井医大・生理1）

Kチャンネルの不活性化機構には、N型とC型の2種類がある。チャンネルの一部分のペプチドが、細胞質側からイオンボア内に入り込むことによって、チャンネルを不活性化するN型に対して、C型はイオン選択性フィルター近傍の構造変化によって引き起こされる不活性化であると考えられている。C型不活性化は細胞外のK⁺濃度が高くなると、遅くなるため、イオンのチャンネルへの結合が不活性化を阻む、foot in the door モデルが提唱されている。本研究では、このC型不活性化に関与するイオンの結合サイトの性質を調べた。HERG(human ether-a-go-go related gene product)は電位依存性のKチャンネルであり、心筋活動電位の再分極相に寄与する。Kチャンネルとして特徴的な点は、N型不活性化機構をもたず、非常に速いC型不活性化機構をもつところである。本研究ではこのチャンネルのC型不活性化に対する細胞外イオンの影響を *Xenopus oocyte* を用いた two electrode 電圧固定システムで測定した。細胞外のイオンをK⁺から種々の1価カチオンに置き換えると、不活性化の時定数は、RbAeCsAeKAeLiAeNa、となり、イオン半径の大きいものほど、時定数が大きい傾向がみられた。これに対して、チャンネルボア全体でのイオン選択性は、KAeRbAeCsAeNaAeLiと異なっていた。発表ではKチャンネルのイオン透過路とC型不活性化に寄与するイオン結合サイトの相関について議論する。

H.Shimizu, K.Yamada and S.Oiki : An ion binding site competing with C-type inactivation

3P223

毛様体筋の持続収縮時のカルシウム流入経路としてのムスカリン作動性陽イオンチャンネル：視覚遠近調節に関与する信号伝達経路

○高井 章¹、高井 佳子²、三宅 養三²、成瀬 恵治³（¹名大院・医・分子動態、²名大院・医・眼科、³名大院・医・細胞生物物理）

【目的】(1) 毛様体平滑筋に存在しムスカリン受容体刺激により開口する非選択性陽イオンチャンネル(NSCC)の性質を調べる。(2) trp 遺伝子の発現を RT-PCR 法により検索する。【方法】単離ウシ毛様体筋細胞において電位固定法により全細胞膜電流を記録。灌流液には HEPES-Krebs 液 (pH 7.4) を使用、電極には K⁺ を含まず、100 mM Cs aspartate, 5 mM-BAPTA ([Ca²⁺]=70 nM) と 200 mM-GTP (pH 7.0) を含む液を充填して用いた。実験は 30℃ で実行した。PCR 用プライマは、ヒトまたはマウス trp (trp1-trp7) の既知配列をもとに、チャンネル孔形成部と予想されている 100-130 アミノ酸に対応する部位を挟むように設計した。【結果と考察】保持電位 -50 mV で、カルバコール (CCh; 2 μM) の外液投与は、内向き電流を惹起した。電流ノイズ解析により、単位コンダクタンスを 35 pS と 100 fS と大きく異にする 2 種の NSCC (NSCC_L と NSCC_S) の存在が示唆された。灌流液中の陽イオン全置換に伴う逆転電位の変化から、イオン透過性は、NSCC_L については Cs⁺ > Na⁺ > Li⁺ > Ba²⁺ ≈ Sr²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ と一価陽イオンの方が高いのに対し、NSCC_S については Ba²⁺ > Sr²⁺ > Ca²⁺ > Mg²⁺ > Cs⁺ > Na⁺ ≈ Li⁺ と逆に二価陽イオンの方が高いことが分かった。La³⁺, Gd³⁺ または SKF96365 の外液投与 (10-100 μM) は、NSCC_L および NSCC_S を可逆的に抑制するとともに、CCh 投与に伴う筋収縮の持続相のみを強く抑制した。毛様体筋は電位依存性 Ca²⁺ チャンネルを欠如しているため、これらの NSCC が持続収縮に必要な Ca²⁺ 流入経路となる可能性がある。一方、RT-PCR による検索で、最近、薬剤作動性チャンネルを形成することで注目されているヒト trp3 および trp6 に対応する trp の発現を確認した。電気生理学的に観察された NSCC_L や NSCC_S との関連に興味を持たれる。

A.Takai, Y.Takai, Y.Miyake and K.Naruse : Non-selective cation channels as possible entry routes for calcium entry during tonic contraction of ciliary muscle

3P222

食用蛙赤血球膜上の IK チャンネルの細胞内側マグネシウムイオンによる活性調節

進藤 昌彦、○相馬 義郎、今井 雄介（大阪医大・生理）

食用蛙赤血球膜上に、新しい細胞内側 Mg²⁺ による調節性を持つ intermediate conductance K⁺ (IK) チャンネルを同定した。両側を 117.5 mM K⁺-rich 溶液で還流した場合、そのシングルチャンネル電流-電圧特性はほぼ線形で、シングルチャンネルコンダクタンスは約 60 pS であった。この IK チャンネルは数〜数 10 msec duration の spikey な brief opening を見せ、チャンネル活性は膜電位非依存性であった。これらのボア特性は我々が、以前に同じく食用蛙赤血球膜上に同定した ATP-inhibitable Ca²⁺-activated IK チャンネルのボア特性 (Shindo *et al.*, *Biophys.J.* **79**:287-297) とほぼ同じ物であった。しかしながら、今回我々が同定した IK チャンネルの活性は、細胞質側 ATP および Ca²⁺ に非依存性であった。しかも、細胞内側 Mg²⁺ は、従来報告されているようなシングルチャンネルカレントの減少だけではなく、そのチャンネル活性 (open probability) を濃度依存性 (Hill constant = 1) かつ、ほぼ膜電位非依存性に抑制した。

M.Shindo, Y.Sohma and Y.Imai : Regulation by magnesium of an IK channel on bullfrog erythrocytes

3P224

マスト細胞におけるカルシウムイオン流入活性化機構の研究

○平嶋 尚英、中西 守（名市大院・薬）

【目的】アレルギー担当細胞であるマスト細胞からの炎症性メディエーターの放出には外液からのカルシウムイオンの流入が不可欠である。このカルシウムイオン流入は細胞内のカルシウムストアの枯渇によって活性化されることが知られているが、カルシウムストアの枯渇からカルシウムチャンネルの活性化へ至る経路については全く明らかになっていない。そこで本研究では、このカルシウムイオン流入の活性化機構を明らかにすることを目的とした。【方法】マスト細胞としてラット好塩基球株である RBL-2H3 細胞を用い、Fura-2 による細胞内カルシウム濃度動態の観察を蛍光分光光度計を用いて行なった。細胞への刺激は RBL-2H3 細胞を IgE で感作後、抗原 (DNP-BSA) を添加することにより行なった。また、ストア枯渇依存性のカルシウム流入を観察する場合は、外液カルシウム非存在下でタブシガルギン処理をしてカルシウムストアを枯渇させ、その後外液のカルシウムイオン濃度を増加させた。【結果と考察】カルシウムストアの枯渇によって活性化されることが知られている TRP (transient receptor potential) チャンネルの活性化には、カルシウムストアと形質膜の近接及び IP3 受容体が関与していることが示唆されている。そこで、形質膜直下の cortical actin を calyculin A で安定化させた場合と、IP3 受容体を xestospongine C でブロックした場合についてカルシウム動態を調べた。その結果、calyculin A 処理では、抗原刺激によるカルシウム流入はほとんど影響を受けなかった。一方、xestospongine C 処理ではタブシガルギン処理後のカルシウム流入が有意に抑制された。これらのことから、マスト細胞における外液カルシウムイオンの流入には IP3 受容体が関与しているが、カルシウムストアと形質膜の近接の寄与は少ないことが示唆された。

N. Hirashima and M. Nakanishi : The mechanism of activation of calcium influx in mast cells