3R1000

Ca²⁺透過性の伸展活性化チャネルMid1の形質膜へのターゲッティング

○宮脇 千賀子^{1,2,3}、辰巳 仁史^{1,2}、飯田 秀利^{2,3}、曾我部 正博^{1,2,4} (¹名大院・医・細胞情報医学、²JST・CREST、³学芸大・教育・生物、⁴JST・ICORP・細胞力覚)

イオンチャネルを構成するタンパク質分子は細胞内で翻訳合成された後、形質膜へターゲッティングされ、イオンチャネルとして機能する。チャネルタンパク質分子の膜へのターゲッティングには、シグナルペプチド、グリコシレーション、Secなどの小胞輸送タンパク質などが関与することが示されているが、Ca²⁺透過性伸展活性化(SA)チャネルの形質膜へのターゲッティングの分子機構はほとんど明らかになっていない。出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)から単離されたMid1はこれまでにクローニングされた唯一のCa²⁺透過性伸展活性化チャネルである。本研究ではMid1の形質膜へのターゲッティングの分子機構を検討した。Mid1の細胞内局在を調べるためにMid1にGFPを融合した融合タンパク質を作製して標的細胞に導入発現させた後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。まず、Mid1の輸送経路を特定するために、小胞輸送過程に欠損のある様々の変異株(*sec6*、*sec7*、*sec12*)に作製した融合タンパク質を発現させてその細胞内局在を観察したところ、小胞体からゴルジ体への輸送はSec7とSec12に依存した経路を介していることが判明した。Mid1には16箇所の推定上のN-グリコシレーション部位が存在する。出芽酵母をツニカマイシン処理してタンパク質分子のグリコシレーションを阻害するとMid1の膜への移行が阻害され、グリコシレーションが膜へのターゲッティングに必要であることが示唆された。Mid1の種々のdeletion mutantsの膜ターゲッティングに関する結果も併せて報告する。

C.Miyawaki, H.Tatsumi, H.Iida, M.Sokabe : Membrane trafficking of a stretch-activated channel, Mid1, in *Saccharomyces cerevisiae*

3R1030

Effects of amphipaths on a stretch activated BK channel(SAKCa) cloned from chick heart

○威 智¹、成 瀬 恵 治^{1,2}、曾我部 正博^{1,2} (¹J S T. 細胞力覚、²名大. 医. 生理)

Due to the more negatively charged inner leaflet of the cell membrane, cationic and anionic amphipaths are in favor of inserting into one leaflet of the membrane. Such insertion can make convex or concave curvature in the membrane, and consequently exerts tension on membrane proteins. This property has given a basis for the idea that the mechanical gating force can come from the surrounding lipids to activate the mechanosensitive channels, such as MscL from *E. coli* and some of the two pore domain K⁺ channels. Recently, our lab has found that SAKCa channel, a BK channel cloned from chick heart, can be activated by membrane stretch, while deletion of STREX-exon, an alternative splice exon composed of 59 amino acid residues in the C-terminus region, abolishes the stretch-sensitivity of the SAKCa channel. In the present study, we demonstrate that both channels, no matter whether it is activated by membrane stretch or not, can be activated by amphipaths. However, the STREX-deleted SAKCa channel has much lower sensitivity to amphipaths than that of the wild type, in good agreement with the results from mechanical stretch. Cationic and anionic amphipaths were able to compensate for each other's effect, indicating that amphipaths modify the SAKCa channel gating through the tension in the bilayer membrane but not through specific bindings to the channel protein. Ionic amphipaths may be an alternative good tool to generate tension in the membrane in the study of SA channels.

Z. Qi, K. Naruse, M. Sokabe : Effects of ionic amphipaths on a stretch activated BK channel(SAKCa) cloned from chick heart

3R1015

トリ心筋SAチャネル遺伝子のクローニングと機能的発現

○成瀬 恵治^{1,2}、塘 涼瑤¹、威 智²、曾我部 正博^{1,2} (¹名大院・医学系研究科・細胞情報医学、²ICORP・「細胞力覚」・JST)

我々は以前、培養トリ心室筋細胞には5種類のSA(Stretch Activated)チャネルがあり、そのうちの高コンダクタンスKチャネルが主要なSAチャネルであることを報告した(Am J Physiol. 276:H1827,1999)。今回我々は、このK透過性SAチャネルの遺伝子をクローニングしてアミノ酸配列決定を行い、CHO細胞での機能的発現に成功した。このチャネルは1067アミノ酸からなり、膜7回貫通部位を有し、既存のカルシウム依存性Kチャネル(BKチャネル)と高い相同性があり、細胞質に面するC末端領域にSTREX配列と呼ばれる59アミノ酸残基をもつBKチャネルのalternative splicingであることが判明した。この遺伝子をCHO細胞に発現してパッチクランプ法で解析したところ、約280pSのコンダクタンス(150mM K中)を示し、パッチピペットに吸引刺激を与えるとその開確率が上昇する機械受容活性を示した。トリ内耳ではSTREX配列のないBKチャネルの電気生理学的特性が調べられているが、機械受容活性については報告されていない。このことからトリSTREX配列が機械受容活性に重要な役割を持っている可能性があると考え、SAKCaチャネルからSTREX配列を除去したところ機械受容活性が消失した。トリ型STREX配列がSAKCaチャネルの機械受容活性に重要な役割をはたしていることが判明した。

K. Naruse, Q. Tang, Q. Zhi, and M. Sokabe : Molecular cloning and functional expression of a SAKCa channel gene from chick heart

3R1045

ミトコンドリア膜透過性遷移と活性酸素種発生の関連性の検討

○服部 友裕、渡辺 功一、太田 善浩 (農工大院・工・生命工)

【背景】細胞内では主にミトコンドリアで活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)が発生し、その発生はミトコンドリアの電子伝達系の酸化還元状態に依存する。近年、ミトコンドリア内膜の透過性の上昇が、細胞内Ca²⁺シグナルの増幅やApoptosisの誘発に関与しているという報告がある。また、この膜透過性遷移(PT;Permeability Transition)が電子伝達系の酸化還元状態に大きな影響を及ぼすため、PTは活性酸素発生の主要な制御機構である可能性がある。本研究では、単一ミトコンドリアでの膜電位を時間分解計測することで内膜の透過性遷移を検出し、PTとROS発生の関連性について検討した。

【方法】ブタ心筋より単離したミトコンドリアをカバーガラスに固定し、膜電位感受性蛍光色素TMREで染色した後、蛍光顕微鏡を用いてミトコンドリア個々での蛍光強度を時間分解計測した。また、活性酸素の発生量は過酸化水素の生成量を測定することにより検出した。

【結果】NADHの合成を促進させる呼吸基質を添加すると、ミトコンドリアの膜電位は急激な分極・脱分極を繰り返した。この急激な脱分極の頻度は、呼吸基質の濃度依存的に増加し、一方でPTを誘発するPTPoreの阻害剤によって抑えられた。また、同条件下でミトコンドリア内に親水性のCalceinを負荷した結果、呼吸基質の添加に伴いミトコンドリアのCalceinの蛍光強度が減少し、PTが生じていることが確認できた。次に、電子伝達系のシトクロムc酸化酵素の阻害剤であるNaN₃により、電子伝達系が還元状態を回避できない状態と、ADP非存在下で電子伝達系は還元されるもののPTによりその状態を回避できる状況とで活性酸素の発生量を比較すると、前者に比べて後者では活性酸素の発生量が大きく下回った。

【考察】このことから、PTは電子伝達系の還元状態を回避して活性酸素の発生を抑制する機構である可能性が示唆される。

T.Hattori,K.Watanabe,Y.Ohta : Relationship between mitochondrial permeability transition and reactive oxygen species generation.