B613

神経系伝達物質は表皮ケラチノサイトに発現するイオンチャネル内蔵型受容体を通じて皮膚バリアー再生、表皮増殖性異常に作用する。

○傳田 光洋、藤原 重良、井上 かおり（資生堂ライフサイエンス研究センター）

神経系にはカチオンを選択的に通過させる受容体、塩素イオンを選択的に通す受容体が存在し、各々神経系の興奮と抑制を担っている。我々は表皮を形成する上皮系細胞であるケラチノサイトにもこれらのイオンチャネル内蔵型受容体が存在し、皮膚角質層バリアー再生や表皮増殖性異常に関与していることを見出した。興奮性神経伝達物質であるATP、ニコチン、グルタミン酸の外用は角質層バリアー機能破壊後の回復を遅延させた。各々の受容体阻害剤はこの遅延をブロックした。逆に抑制性の神経伝達物質であるGABAやグリシンの外用はバリアー回復を促進し、この変化は各々の受容体阻害剤でブロックされた。カルシウムイオノフォアの外用はケラチノサイトにおいてバリアー機能を担う脂質を含む顆粒のエキソサイトーシスを抑制しバリアーの回復を阻害した。一方、クロライドイオノフォアの外用は脂質を含む顆粒のエキソサイトーシスを促進しバリアー機能の再生を促進させた。これらの結果は始めに示した各種神経伝達物質の作用がイオンチャネルを介したものであることを示唆している。さらにイオンチャネル内蔵型ATP受容体特異的阻害剤、およびGABAの外用は乾燥環境下で惹起された表皮増殖性異常を抑制した。以上の結果は、中枢神経系と同様外胚葉由来の表皮には、神経系と類似のイオンチャネル内蔵型受容体が存在し、それらが表皮バリアー機能の維持や表皮ケラチノサイトの増殖に関与していることを示している。

M.Denda, S.Fujiwara, K.Inoue : Neurotransmitters affect skin barrier homeostasis and epidermal proliferation through ionotropic receptors in keratinocytes.

B615

ミトコンドリア膜に存在するイオンチャネルの性質

○小林 進哉、葛西 道生（龍谷大・理工・物質化学）

細胞のプログラム細胞死（アポトーシス）はミトコンドリアのCa²⁺チャネルが深く関係しているといわれている。そこでアポトーシスについての機構を解明するためにミトコンドリアに存在するCa²⁺チャネルのコリンの透過性を、筋小胞体(SR)のCa²⁺チャネルとの比較をするためにATP、ruthenium Red、Mg²⁺等のSRに対するactivatorやinhibiterを用いてその影響をストップドフロー法によって測定した。その結果、SRのCa²⁺チャネルをブロックするMg²⁺やruthenium Redはミトコンドリアのチャネルに対して影響を及ぼさなかった。しかしSRのactivatorであるATPのみが影響を及ぼし、SRとは逆にチャネルに対するブロッカーとして働いていた。このことから今回観察しているチャネルはSRのCa²⁺チャネルとは異なるものであると考えられ、SRのCa²⁺チャネルを開くリアノジンをを用いてコリンの透過性を測定したが、この効果も認められなかった。そこで、このチャネルに対するCa²⁺の影響を調べた。その結果、mM以上の高いCa²⁺濃度で透過性が上昇することが分かった。そこで、このチャネルに対するATPの効果を調べるためにAMPを用いてコリンの透過を測定した。その結果、Ca²⁺濃度の高領域においてコリンの透過性をAMPが抑制した。以上の結果からここで観測されたミトコンドリアのチャネルはSRのものとは異なる性質のものであることが分かった。このコリンの透過を示したチャネルがカルシウムを通すかどうかは検討中だが、この新しい性質を持つチャネルについての性質を調べることによって、細胞のアポトーシスに関する知見に新しい情報が加えられることが期待される。

S.Kobayashi and M.Kasai : Properties of ion channels in mitochondrial membrane

B614

ガングリオシドGD3がミトコンドリアの膜透過性変化（PT）に及ぼす影響の検討

○樋口 ゆう¹、服部 友裕¹、三浦 剛²、梶本 哲也¹、太田 善浩¹（¹農工大・工・生命工、²野口研）

<背景>本研究では、ガングリオシドがミトコンドリアの膜透過性変化（Permeability Transition、以下PT）に及ぼす影響について検討した結果を報告する。ミトコンドリアのPTは、蛋白複合体からなるチャネル、PTPore（PTP）の開閉によるミトコンドリア内膜をへだてたイオン勾配の急激な電位変化として観察できる。

<目的>近年、ガングリオシドのうちGD3は、ミトコンドリアに作用し、不可逆的なPTPopeningを引き起こすことで膜電位の消失及びcytochrome cの放出を引き起こし、以後のアポトーシス経路を活性化させるとされる。本研究では、ミトコンドリアの膜電位を時間分解計測して、ミトコンドリアの分極状態の時間経過に及ぼすGD3の影響を検討した。

<測定方法>材料には豚心筋より単離したミトコンドリアを用い、蛍光顕微鏡を用いて単一ミトコンドリアの膜電位を時間分解計測した。<結果>45μMのGD3を系に添加すると膜電位は急速に消失し、これは基質添加後も続いた。このとき、PTPの阻害剤であるCsAを用いた系では、基質添加で膜電位は復活した。これよりGD3がPTPを不可逆的に開かせる事を確認した。一方10μMのGD3でincubationした系では、コントロールとしてDMSOを加えた系と比較すると、PTPの一時的な開閉が抑えられており、その後にPTPは不可逆的に開いた。また、この時、活性酸素種（ROS）の一種である過酸化水素の発生量が上昇していることを観察した。これらの結果はGD3がPTPの一時的なopeningを抑えることが、ROS発生量増加を誘発する可能性、またこの過程がPTPの不可逆的なopeningを引き起こすことを示唆するものである。当日は、各種ガングリオシドでの実験結果も合わせて報告したい。

Y. Higuchi, T. Hattori, T. Miura, T. Kajimoto and Y. Ohta : The effect of ganglioside GD3 on mitochondrial Permeability Transition(PT)

B616

ミトコンドリアの呼吸時における膜透過性遷移の検出

○上地 悠紀子、服部 友裕、太田 善浩（農工大・工・生命工）

【背景】ミトコンドリアにはPermeability transition pore（PTP）と呼ばれる内膜の透過性を著しく変化させるチャネルが存在する。本研究では、ミトコンドリアの活性と対応させながら、このチャネルの開閉を調べるため、単一ミトコンドリアにおける膜電位の経時変化を検出した。また、マトリックスからの色素の流出を測定することによって、膜透過性遷移を検出し、膜電位の経時変化の結果と合わせて検討した。【方法】単一ミトコンドリアでの膜透過性変化を検出するために、豚心筋より単離したミトコンドリアを活性を保ったままカバーガラスに固定した。次にこのミトコンドリアを膜電位感受性蛍光色素TMREで染色し、蛍光顕微鏡と冷却CCDカメラを用いて個々のミトコンドリアでの蛍光強度の経時変化を計測した。また、親水性の蛍光色素であるcalcein-AMをミトコンドリアのマトリックスに取り込ませ、calceinのマトリックスからの流出を測定することにより、膜透過性変化の検出を試みた。【結果】NADHの合成を促進させる呼吸基質であるリンゴ酸を添加することで、個々のミトコンドリアで膜電位の分極が観察され、その後脱分極・分極を繰り返した。この急激な脱分極の頻度は、ADPによって抑えられた。また、ミトコンドリアから放出されたcalceinの量は、リンゴ酸の添加により増加し、またADPの添加によって減少し、ミトコンドリア内膜の急激な脱分極の頻度とよい相関を示した。【考察】ミトコンドリアは通常の呼吸でも膜透過性の遷移を繰り返す可能性が示唆された。また、PTPの開閉と活性酸素種（ROS）の関連性についても今後報告していきたい。

Y. Uechi, T. Hattori, Y. Ohta : Detection of mitochondrial permeability transition during respiration