2P221

神経毒 α -ラトロトキシンを用いたマスト細胞における脱顆粒機構の解析

○平嶋 尚英、中西 守 (名市大院・薬)

【目的】 α -ラトロトキシンは、神経終末からの神経伝達物質の過剰放出を誘導する神経毒である。その機構として、イオノフォアとしての作用と SNARE タンパク質をはじめとするシナプス小胞と形質膜の融合装置への作用が考えられている。我々は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 SNARE タンパク質が関与していることを明らかにしてきた。そこで本研究では、マスト細胞に α -ラトロトキシン受容体を発現させた系を用いて、 α -ラトロトキシンによるマスト細胞の脱顆粒 (エクソサイトーシス) 誘導について検討した。

【方法】 α -ラトロトキシンの受容体であるラトロフィリンを蛍光タンパク質である YFP との融合タンパク質として、マスト細胞株 (RBL-2H3 細胞) に発現させた。細胞内カルシウム濃度動態は Fura-2 を用いて、脱顆粒は β -hexosaminidase 活性を定量して評価した。YFP 融合ラトロフィリンは、共焦点レーザー顕微鏡により可視化解析した。

【結果と考察】 ラトロフィリンは形質膜に局在し、細胞質や分泌顆粒膜等には観察されなかった。外液 Ca^{2+} 存在下でラトロトキシンを作用させると、ラトロフィリンを発現していない野生株の RBL-2H3 では、ラトロトキシンによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と脱顆粒は誘導されなかったが、ラトロフィリン発現株ではラトロトキシンの濃度依存的に Ca^{2+} 濃度上昇と脱顆粒がともに誘導された。一方外液 Ca^{2+} 非存在下では脱顆粒はほとんど誘導されなかった。これらのことから α -ラトロトキシンはマスト細胞においては主にイオノフォアによる作用によって脱顆粒を誘導することが示唆された。現在さらに α -ラトロトキシンによる脱顆粒誘導機構を詳細に追究するために、 Ca^{2+} イオノフォアである A23187 の作用と比較検討を行っている。

N. Hirashima and M. Nakanishi : Analysis of degranulation mechanism in mast cells with latrotoxin

2P223

非電解質の中心空洞へのアクセスは KcsA カリウムチャネルの開確率を増大させる

○清水 啓史、井上 史子、今野 卓、老木 成稔 (福井大学・医学部・分子生理)

KcsA チャネルは立体構造解析の最も進んだイオンチャネルである。一方で、開確率が極めて低いため、機能解析には不向きである。本研究では KcsA チャネルの開確率を上昇させる因子を見つけることに成功した。KcsA チャネルを脂質二重膜に再構成し、改良 tip-dip 法により単一チャネル電流測定を行った。sucrose の KcsA チャネルゲーティングに対する影響を調べた結果、sucrose 濃度の上昇 (10-30% (w/w)) につれ単一チャネル電流は小さくなり、開確率が非常に大きくなることがわかった。sucrose を細胞質側にのみ加えるだけでも開確率の上昇が起きた。チャネルに対する非電解質の効果が両側添加で起こりチャネル内外の浸透圧差によって閉状態が安定化されるという従来の解釈はこの結果に当てはまらない。他の非電解質 (sorbitol, glycerol, ethylene glycol) についても同様に、開確率の上昇が起きた。細胞質ドメインを酵素処理によって除去し、膜貫通領域のみで測定した場合でも、非電解質による開確率の上昇が起きた。KcsA チャネルの膜貫通領域は非対称な立体構造をしており、中央空洞と呼ばれる膜貫通領域中央の空間に非電解質は細胞内からしか到達できない。上記の実験結果は、非電解質がチャネル中央空洞において作用し、細胞質ドメインの関与は少ないことを示している。ethylene glycol, PEG200, PEG400 と非電解質の分子サイズを変えて測定した。酵素処理を行った KcsA チャネルにおいて、ethylene glycol, PEG200 は開確率の上昇が起きるが、PEG400 では起きないことがわかった。この結果から開確率を上昇させるには、開状態において非電解質が中央空洞へ到達することが必要であると考えられる。

H.Shimizu, F.Inoue, T.Konno, S.Oiki : Access of non-electrolytes to the central cavity increase the open probability of KcsA potassium channel.

2P222

カーボンナノチューブにおけるイオン移動の理論的研究

○炭竈 享司、斉藤 真司、大峯 巖 (名大院理)

生体内の神経におけるシグナル伝達は、イオンチャネルが受動輸送によりイオンを輸送することで行われる。現在 3 次元構造の分かっているイオンチャネルは少なく、それらに対する理論計算も未だイオン移動のダイナミクスを明らかにしたとは言えない。またイオンチャネルの中のイオンは膜電位により動いているが、膜電位をあらわに取り扱ったものは少ない。我々は一般的なイオンチャネル (gramicidin, K^+ チャネル) におけるイオン移動を調べているが、今回そのモデルとしてカーボンナノチューブを分子動力学法 (MD) により計算した結果を紹介する。

まずカーボンナノチューブを並べ、その周りに水と Na^+ イオン、 K^+ イオン、 Cs^+ イオンを配置した。計算の結果水分子は自発的にカーボンナノチューブの中に入ったが、イオンは全て入らなかった。そこで gramicidin のカルボニル酸素の配置をまね、周期的にカーボンナノチューブの原子上に負の電荷を置いたところ、どのイオンも自発的に入った。次に 600mV/(25 Å) の電場をカーボンナノチューブにかけイオン移動の様子を調べた。電場の存在下ではイオンの流れを観測でき、これを解析することで入ってくるイオンが出て行くイオンを押し出していることが分かった。またイオン種の違いにより、イオンの流れ易さの違いを観測できた。さらに詳しくイオン移動を調べるため、イオン透過に関する自由エネルギーを計算した。現在それらの詳細な解析を進めており、当日報告する。

T.Sumikama, S.Saito, and I.Ohmine : Theoretical Study of Ion Translocation in Carbon Nanotube

2P224

蜘蛛毒ペプチド GsMTx-4 は電位依存性ゲーティング機構の修飾を通して伸展感受性 bigKca チャネルを抑制する

○唐 瓊¹、成瀬 恵治^{1,2}、Frederick Sachs^{1,3}、曾我部 正博^{1,2,4} (1JST・ICORP・細胞力覚、²名大院・医・細胞生物物理、³ニューヨーク州立大・医・生理/生物物理、⁴生理研・分子生理)

Very recently the peptide GsMTx-4 from spider (tarantula, Grammostola spatulata) venom was reported to be a promising candidate for a specific blocker of mechanosensitive channels (MSCs). However, its actions to MSCs are poorly characterized. Here we report that GsMTx-4 can block the stretch activated and Ca^{2+} -activated big K channel (SAKcaC) from chick embryonic myocardial cells. Single channel currents of the SAKcaC were recorded mostly from excised inside-out patches and negative pressure was applied in the pipette to stretch the patch. GsMTx-4 was applied to the extracellular surface of the patch using the back-fill method. Open probability of the channel (P_o) was significantly reduced by 50nM GsMTx-4 without changing single channel conductance, suggesting that the peptide inhibits channel activity by either slow blocking or gating modification. The Po-V (membrane potential) curve of SAKcaC exhibits sigmoidal shape with a half activation voltage of ca.-88mV with 1mM Ca^{2+} at the cytoplasmic face. When suction (-40mmHg) was applied in the pipette, Po-V curve shifted left by approx 40mV, while 50nM GsMTx-4 shifted right the curve by approx. 40mV. When the same amount of suction was applied after a 50 nm GsMTx-4 application, the apparent inhibition by the peptide was almost completely compensated. It is likely that both the stretch activation and the peptide inhibition of SAKcaC are caused through the modification of voltage gating of the channel.

QY.Tang, K.Naruse, F.Sachs, M.Sokabe : The spider toxin GsMTx-4 inhibits stretch-activated big Kca channel through the modification of voltage gating mechanism