



Title	脂質平面膜法による骨格筋筋小胞体イオンチャネルの精製
Author(s)	井出, 徹
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37922
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	井 出 徹
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 1 0 2 9 1 号
学位授与年月日	平成 4 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 基礎工学研究科 物理系専攻
学位論文名	脂質平面膜法による骨格筋筋小胞体イオンチャンネルの精製
論文審査委員	(主査) 教 授 葛西 道生 (副査) 教 授 柳田 敏雄 教 授 村上富士夫

論 文 内 容 の 要 旨

従来、イオンチャンネル蛋白質の精製には、阻害剤などの特異的標識分子が用いられてきた。しかし、筋小胞体のKチャンネル及びClチャンネルにおいては、精製に適した標識分子の存在が知られていない。そこで本研究では、クロマトグラフィーによって分離されたタンパクのチャンネル活性を、脂質平面膜法によって検定することにより精製を行った。

ウサギの脚筋及び背筋より精製した筋小胞体ベシクルを、3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) で可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーによってタンパクを分離した。各分画にアゾレクチンを添加、透析によってタンパクをベシクルに再構成した。それらを脂質平面膜法で調べ、目的のチャンネル活性を持っている分画をゲル濾過クロマトグラフィーにかけ、さらに精製した。同様に、ゲル濾過分画のうち、チャンネル活性を示したものをCon A Sepharoseによるアフィニティクロマトグラフィーでさらに精製した。

3つのクロマトグラフィーによって得られた、分子量約100 kDaのタンパクのみを含む分画にチャンネル活性があり、再構成されたチャンネルは、

- ①正イオンを選択的に透過させた。
- ②単一チャンネルコンダクタンスが約120pSであった。
- ③開状態の約2/3のコンダクタンスを持つサブコンダクタンス状態を持っていた。
- ④細胞質側が高電位の時、開確率が高かった。
- ⑤K⁺を他の正イオンよりよく透過させた。
- ⑥ネオマイシンBによって阻害された。

これらは、筋小胞体のKチャンネルの性質と良く一致する。よって、筋小胞体のKチャンネルは、分子量約100 kDaのタンパクによって構成されていることが分かった。

また、分子量約100 kDaのタンパクと、少量の120 kDaのタンパクを含む分画にチャンネル活性があり、

①陰イオン選択性のチャンネルであった。

②高電位で開確率が下がった。

③硫酸イオンによって阻害された。

これらは、筋小胞体のClチャンネルの性質と良く一致する。よって、筋小胞体のClチャンネルは、分子量約100 kDa、または120 kDaのタンパクによって、あるいは、その両方によって構成されていると思われる。

論文審査の結果の要旨

生体膜を介してのイオンの移動は電気的な信号伝達やイオンそのものの移動による信号伝達など生体にとって必須のものである。しかし、生体膜を構成する脂質はイオンを通さない構造であるからイオンの移動は膜に埋め込まれたイオンチャンネル分子を介して行われる。このように重要なイオンチャンネルのイオン透過メカニズムを理解するためにはチャンネル分子を単離してその構造を明らかにする必要がある。イオンチャンネルはタンパク質であるが一般にはその量は非常に少なく、極端な場合には細胞あたり数個しか存在しないことがある。今までのイオンチャンネルの単離はそれらに特異的に結合するリガンドを用いて、これに結合する分子を探すという方法で行われてきた。しかし、自然界には多くのイオンチャンネルが存在し、それらには必ずしも特異的なリガンドは存在しない。

本論文は、このような特異的なリガンドが存在しない典型的な例である筋小胞体のKチャンネルとClチャンネルについて、可溶化した膜タンパクを各種のクロマトグラフィーを適用して分画し、それらを人工膜に埋め込みイオンチャンネル活性を測り、活性のある分画を探すという正攻法でチャンネル分子を単離・精製することに成功したものである。

著者は、ウサギ骨格筋から筋小胞体ベシクルを精製し、これを表面活性剤で可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーによってタンパク質を分離した。各分画にアゾレクチンを加え透析法によってタンパク質をベシクルに再構成し、これらを脂質平面膜に組み込みチャンネル活性のある分画を得た。これを更にゲル濾過クロマトグラフィーにかけ精製した。更に活性を示す分画をCon A-Sepharoseによるアフィニティークロマトグラフィーにかけて精製した。その結果Con Aカラムに結合しない分画からKチャンネルが、結合する分画からClチャンネルが精製された。

単離されたチャンネルタンパクは何れも分子量約100 kDaであった。筋小胞体の膜には分子量約100 kDa ポンプタンパクが大量に存在することが分かっているのに、その混入ではないことをポンプの抗体を使って示した。単離されたタンパクは人工膜上で天然のチャンネルと区別がつかないような振る

舞いを示し、この方法によってチャンネルタンパク質が変性などの影響を受けていないことも示した。この方法は著者が様々な方法を検討した結果確立したもので、特異的なリガンドが見つからないイオンチャンネルの精製に広く適用することができる一般的な方法といえる。

以上のように、本論文は新しいイオンチャンネルの精製法を確立したもので、分子生理学の分野に重要な知見を与えるものであり、学位論文として価値あるものと認める。