

Title	Anion Channels in the Chara Plasmalemma : A Patch-Clamp Study
Author(s)	沖原, 清司
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38242
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏 名	沖 原 清 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 4 2 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 9 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 該 当 基礎工学研究科 物理系専攻
学 位 論 文 名	Anion Channels in the <i>Chara</i> Plasmalemma: A Patch-Clamp Study (シャジクモ原形質膜のアニオンチャンネル：パッチクランプ法を用いた研究)
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 教 授 永 井 玲 子

論 文 内 容 の 要 旨

シャジクモ節間細胞は興奮性を示す植物細胞の代表的な実験材料である。興奮時にこの細胞は多量の Cl^- イオンを放出する。これは、原形質膜の Ca^{2+} -activated Cl^- channel が開くことによる。本論文では、このチャンネルの開閉が Ca^{2+} に依存してどの様に制御されるかを inside-out patch-clamp 法を用いた実験系を確立することにより明らかにした。

材料は *Chara corallina* を使用した。原形質膜を露出させるため、高張な溶液中で原形質分離し、細胞壁に鋭利な剃刀を利用して窓を開けた。その窓を通してパッチ電極を原形質膜に押しあてギガオーム以上のシール抵抗を得た。その後パッチ電極を細胞から離し、チャンネルの挙動を inside-out patch-clamp 法で観察した。 Cl^- 電流を主に記録するために溶液の組成として Cl^- イオン以外は膜を通りにくいイオンを使用した。すなわち、 TMA^+ , Cs^+ , CH_3SO_3^- , TES^- である。細胞内に相当する溶液の Ca^{2+} は EGTA で、0.1, 1.0, 10 μM の濃度になる様に緩衝し、液の交換は灌流によって行なった。これらの Ca^{2+} 濃度は生理条件下での細胞質 Ca^{2+} 濃度変化に対応出来る範囲である。

Cl^- 濃度、膜電位、 Ca^{2+} 濃度の変化に対するチャンネルの依存性を調べることにより、原形質膜には A 型、B 型に分類できる少なくとも 2 種類の性質の異なる Cl^- 感受性のチャンネルの存在することを明かにした。特に A 型のチャンネルの開閉は Ca^{2+} と電圧の 2 つのパラメータに強く依存した： Ca^{2+} の 0.1 μM 濃度では殆ど開かない。しかし、 Ca^{2+} 濃度 1.0 μM では膜電位の -40 – -180mV の限られた範囲のみで活発に開く。さらに高い Ca^{2+} 濃度 10 μM ではチャンネルの opening は抑制される傾向を示した。このチャンネルの単位コンダクタンスは 9 pS (25mM Cl^-) であった。一方、B 型のチャンネルの挙動は Ca^{2+} 濃度依存性が顕著でなく膜電位が負になるに従い開確率が上がった。なお B 型のチャンネルの場合はサブコンダクタンスの出現が頻繁であるのに対し、A 型のチャンネルではその出現は稀であった。A 型のチャンネルの開閉の電圧依存性は Ca^{2+} 濃度に強く依存するので Ca^{2+} -dependent Cl^- -sensitive anion channel と呼ぶことにした。このチャンネルの挙動は次の点で節間細胞の Ca^{2+} -activated Cl^- channel の挙動と一致した。1) 細胞の静止状態においては通常、細胞質 Ca^{2+} 濃度は 0.1 μM 程度であり、また Cl^- の放出は少量である。本パッチクランプの結果でも 0.1 μM Ca^{2+} ではチャンネルは殆ど閉じた状態であった。2) 細胞の興奮時には

細胞質の Ca^{2+} 濃度は $1.0 \mu\text{M}$ を越え高くなる。この Ca^{2+} 濃度の上昇は Ca^{2+} -activated Cl^- -channel を開き Cl^- の放出を増大させる。今回の結果は Ca^{2+} 濃度を $1.0 \mu\text{M}$ に上げたとき限られた電圧領域 (-160 – -40 mV) で活発にチャンネルは開いた。その開き始める -160 mV 付近は興奮時におけるコンダクタンスの最大になる電圧領域と対応した。3) 本パッチクランプの結果では Ca^{2+} 濃度 $10 \mu\text{M}$ はチャンネルの opening を抑制する傾向があった。このことは細胞内 Ca^{2+} 濃度を細胞内灌流法により変えて得られた結果と一致する。

$1.0 \mu\text{M}$ Ca^{2+} 濃度条件下での opening の活性化にカモジュリンが関与している可能性を、カモジュリン拮抗剤 (W-7, TFP, クロロプロマジン) と植物性カモジュリンを細胞質側溶液に加えることにより検討した。その結果、 $40 \mu\text{M}$ 濃度のカモジュリン拮抗剤はチャンネルを閉じた。一方、植物性カモジュリンは Cl^- -チャンネルの opening を一層活性化した。その結果からこのチャンネルの opening にはカモジュリンの活性化が関与していると結論づけられた。

論文審査の結果の要旨

車軸藻は単細胞植物であるが、動物の神経と同じように興奮して活動電位を発生するので、古くから緑の神経といわれて細胞の興奮現象の研究に広く用いられてきた。それは車軸藻の節間細胞は直径が 0.5 mm 、長さが数 cm にも及ぶ巨大細胞であり、電極の刺入など電気生理学的な研究が容易であったことにもよる。その興奮のメカニズムを分子レベルで解明することは単に植物細胞の興奮機構を明らかにするのみならず、広く細胞の電気的活動を理解する上で重要である。車軸藻の活動電位の発生機構は神経とは異なり刺激により膜電位依存型 Ca^{2+} チャンネルが開き、この Ca^{2+} によって Ca^{2+} 依存型の Cl^- -チャンネルが開くことによっていることがほぼ確定しているが、この Ca^{2+} 依存型の Cl^- -チャンネルを直接シングルチャンネルのレベルで観測することは今まで出来なかった。

申請者は、車軸藻の1種である *Chara corallina* の節間細胞を用いて実験を行った。まず、原形質膜を露出させるために高張液中で原形質分離をさせ、細胞壁の一部に剃刀で孔を開け、そこからパッチピペットを挿入して細胞膜のイオンチャンネルをパッチクランプするという巧妙な方法を開発し、イオンチャンネルの測定に成功した。その結果、A型、B型に分類できる2種類の Cl^- -チャンネルを測定することに成功した。その中でA型は 25 mM Cl^- 中で約 9 pS の単一チャンネルコンダクタンスを示し、 Ca^{2+} 濃度と膜電位に依存して開確率の変化するものであった。 Ca^{2+} 濃度依存性と膜電位依存性を詳しく調べたところ、その性質によって車軸藻の活動電位の大略を説明することができることを示した。また、この Ca^{2+} の感受性はカモジュリンの支配を受けていることを明らかにした。

以上のように、本論文は植物細胞のイオンチャンネル研究に新しい方法を確立し、植物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。