



Title	Photodynamically Activated ion channels in Paramecium membrane
Author(s)	齋藤, 文仁
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40242
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	齋 藤 文 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 2 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 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	Photodynamically Activated ion channels in <i>Paramecium</i> membrane. (ゾウリムシ細胞膜における光増感作用で活性化されるイオンチャネルの研究)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 葛西 道生 (副査) 教 授 佐藤 俊輔 教 授 村上富士夫 助教授 中岡 保夫

論 文 内 容 の 要 旨

本研究は光増感作用に対する細胞応答をゾウリムシ細胞を用いて、調べた。ゾウリムシ細胞膜におけるイオン透過性に注目し、ついて短時間光照射と連続的光照射の場合でそれぞれ調べ、さらにパッチクランプ法によりゾウリムシ細胞膜にある Ca^{2+} 依存性カチオンチャネルの同定も行った。

第一に、短時間の光照射に対して局在する一過性の膜電位応答がみられた。主に前端部では脱分極、後端部では過分極の膜電位変化を示した。この局在する応答を膜電位固定法により調べた結果、脱分極は Ca^{2+} チャネル、過分極は K^{+} チャネルがそれぞれ開くことによって生じていることが分かった。さらに後端部の応答において K^{+} チャネルブロックの実験と細胞内 Ca^{2+} 濃度をキレートした実験から、最初に Ca^{2+} チャネルが開き、そこから流入した Ca^{2+} によって Ca^{2+} 依存性の K^{+} チャネルが開いて過分極することを明らかにした。

第二に、連続的な光照射に対して細胞の生存度と細胞膜のイオン透過性変化について調べた。その際、野生株と光増感作用耐性のある変異株を用いた。細胞遊泳速度の変化と膜電位変化の測定の結果、両株とも細胞が死に至る直前に膜電位は過分極し、細胞の遊泳速度の上昇がみられた。これは K^{+} の透過性が上昇したためであった。細胞の生存に K^{+} が関与していると考え、両株の K^{+} チャネルの性質を調べたところ Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルによるイオン電流の大きさに差がみられた。すなわち Ca^{2+} 依存性 K^{+} 電流が変異株の場合、野生株の3分の1程度であり、短時間の光増感作用によって引き起こされる後端部の K^{+} 電流についても変異株では野生株の3分の1程度になっていることが分かった。これらの結果から光増感作用による細胞死の過程に、 Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルの活性化があり K^{+} の漏洩が関与していることが示唆された。

第三に、前出の両株における Ca^{2+} 依存性 K^{+} チャネルについてシングルチャネルレベルでの差異をパッチクランプ法によりinside-outで調べた。両株で細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇によって活性が上昇するチャネルは主に2種類あり、それぞれの単一コンダクタンスはおおよそ70pSと450pSであった。チャネルの分布は野生株では70pSタイプ、変異株では450pSタイプのチャネルが多く存在していることがわかった。450pSタイプのチャネルは本研究において新規に見つけられたものである。このチャネルは Ca^{2+} 依存性カチオンチャネルであり、電位依存性は70pSタイプとは逆に脱分極で活性が高くなる性質を持っていた。これらの知見から判断すると、野生株では刺激後まもなく Ca^{2+} の細胞内への流入で70pSタイプのチャネルの活性化で過分極し、電位依存的であるため、このチャネルは活性化し続け、大きな K^{+} の漏洩が起こる。一方、変異株は Ca^{2+} が流入すると K^{+} チャネルは同様に活性化し過分極するが45pSタイプの

チャンネルは電位依存性により不活性化するので早期には K^+ の漏洩が起これないため耐性があると説明ができた。

論文審査の結果の要旨

活性酸素は細胞に様々な傷害を与えることが知られている。本論文は、メチレンブルーの光増感作用により発生する活性酸素が細胞膜のイオンチャンネルに与える作用を、単細胞生物のゾウリムシを用いて研究したものである。さらに、イオンチャンネルの詳しい性質を調べるために、単一チャンネルを流れる電流の記憶、解析を行なっている。

第一に、メチレンブルー存在下で数秒間の光スポット照射により、活性酸素を短時間細胞の局所部分に与えた。そうするとゾウリムシ細胞前端部では膜電位の脱分極応答、細胞後端部では過分極応答が引き起こされた。これらの応答を膜電位固定法により調べた結果、脱分極は Ca^{2+} チャンネル、過分極は K^+ チャンネルがそれぞれ開くことによって生じていることが分かった。さらにこの K^+ チャンネルは、細胞内にキレート剤を注入し Ca^{2+} 濃度を低く保つと開かなくなることから Ca^{2+} 依存性の K^+ チャンネルであることが明らかにされた。

第二に、メチレンブルー存在下で連続的な光照射を行ない、活性酸素の細胞への傷害効果を調べた。その際、ゾウリムシ野生株と光増感作用に耐性のある変異株とを比較する研究を行なった。この変異株は野生株よりも細胞死に至る時間が2-3倍長い。両株のイオンチャンネルを電気生理的に測定、比較したところ、 Ca^{2+} チャンネルから流入する電流は同じ程度であるが、 Ca^{2+} 依存性の K^+ チャンネルから流出する電流は変異株の方が野生株の3分の1程度であった。同じく細胞の後端部への光増感作用によって引き起こされる外向き K^+ 電流も、変異株では野生株の3分の1程度であることが分かった。これらの結果から、光増感作用による細胞傷害の過程で、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルの活性化が起これ細胞内からの K^+ の漏洩が起きていることが示された。

第三に、野生株と変異株について、単一チャンネルを流れる電流を記録し、 Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルの比較を行なった。両株から、単一チャンネルコンダクタンスが70pS、450pSと、2種の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルが記録されたが、その分布に株間での違いが見られた。すなわち70pSタイプは野生株に多く、450pSタイプは変異株に多く分布していた。これらチャンネルの電圧感受性等の性質から活性酸素による細胞の傷害に関わるチャンネルは70pSタイプであると結論された。一方450pSタイプは未だ見つけられていない新しいタイプのチャンネルであった。

以上のように、本論文は活性酸素による細胞傷害の過程をイオンチャンネルの活性変化と関連付けて明らかにしたもので、分子生理学の分野で重要な知見をあたえるものであり、学位論文として価値あるものと認める。