The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	骨格筋イオンチャネルの同定と解析
Author(s)	坂本, 裕人
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42171
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

【83】

氏　　名	坂　本　裕　人（さか もと ひろ と）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　15550　号
学位授与年月日	平成12年3月24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	**骨格筋イオンチャネルの同定と解析**
論文審査委員	（主査） 教　授　葛西　道生 （副査） 教　授　村上富士夫　　教　授　倉橋　　隆

論文内容の要旨

骨格筋における筋収縮の一連の反応にはCa放出チャネルを始め様々な種類のイオンチャネルが関与しているが、未だその生理的機能や分子実体が解明されていないチャネルも多い。本研究ではSRのKチャネル、Clチャネル、T管膜のCa依存性Kチャネルについてタンパク分子の同定及び分子クローニングを行った。

SRのイオンチャネルをクロマトグラフィーを用いた生化学的手法と、脂質平面膜法を用いた電気生理学的手法による機能アッセイ法により分離した所、分子量100kDaと138kDaの糖タンパクを含む分画にアニオンチャネル活性がみられた。この2つの糖タンパクは常にco-purifyされることから電気泳動的に単離し、138kDa精製タンパクの部分アミノ酸配列を解析した所、得られたアミノ酸配列はsarcalumenin、53kDa糖タンパクと呼ばれるSRの調節タンパクと相同性が高いことがわかった。これらはSRのCa放出や取り込みに関与している可能性のあるタンパクである。138kDaタンパクはチャネル活性を示さないことからSRのClチャネルは100kDaのタンパクであると考えられる。また138kDa糖タンパクに結合するタンパクを探索し、脂質平面膜に組み込んだところKチャネル活性がみられた。さらに^{45}Ca overlay法の結果Ca結合タンパクであることも判明した。このことから138kDaタンパクはSRのKチャネルを修飾するCa結合タンパクであると考えられる。

つぎにT管膜のCa依存性Kチャネル（rbslo）についてその一次構造を決定した。rbsloはαとβの2つのサブユニットで構成されており、チャネル本体を形成するαサブユニットは約1100アミノ酸からなる分子で、推定11回膜貫通構造を持っている。またその配列中にalternative splicing siteを5つ持っており、少なくとも4つの発現型を持つことが明らかになった。βサブユニットは191アミノ酸からなり推定2回膜貫通領域を持っていて、αサブユニットを修飾するタンパクである。これらクローン化したrbsloチャネルcDNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入してその機能を調べた結果、シングルチャネルコンダクタンスは約220pSで外向き整流性を持つこと、βサブユニットを共発現させたときには立ち上がり時間が早くなり不活性化が起こる。さらにCa感受性が増大してより負の電位でチャネルが活性化する事が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

骨格筋における筋収縮の一連の反応にはCa放出チャネルを始め様々な種類のイオンチャネルが関与しているが、未だその生理的機能や分子実体が解明されていないものも多い。本研究では筋小胞体（SR）のKチャネル、Clチャネル、T管膜のCa依存性Kチャネルについてタンパク分子の同定及び遺伝子クローニングを行いそれらの性質を明らかにしたものである。

先ず、SRのイオンチャネルをクロマトグラフィーを用いた生化学的手法と、脂質平面膜法を用いた電気生理学的手法による機能アッセイ法を開発し、それによって分離した所、分子量100kDaと138kDaの糖タンパクを含む分画にアニオンチャネル活性がみられることが分かった。次いで、この2つの糖タンパクは常にco-purifyされることから電気泳動的に単離し、138kDa精製タンパクの部分アミノ酸配列を解析した所、得られたアミノ酸配列はsarcalumenin、53kDa糖タンパクと呼ばれるSRの調節タンパクと相同性が高いことがわかった。これらはSRのCa放出や取り込みに関与している可能性のあるタンパクである。138kDaタンパクはチャネル活性を示さないことからSRのClチャネルは100kDaのタンパクであると考えられる。また138kDa糖タンパクに結合するタンパクを探索し、脂質平面膜に組み込んだところKチャネル活性がみられた。さらに^{45}Ca overlay法の結果Ca結合タンパクであることも判明した。このことから138kDaタンパクはSRのKチャネルを修飾するCa結合タンパクであると考えられることを示した。しかしこの方法では、これらのタンパク質をさらに精製することができなかった。

次に、T管膜のCa-依存性Kチャネル（rbslo）についてその一次構造を決定した。rbsloはαとβの2つのサブユニットで構成されており、チャネル本体を形成するαサブユニットは約1100アミノ酸からなる分子で、推定11回膜貫通構造を持っていること、またその配列中にalternative splicing siteを5つ持っており、少なくとも4つの発現型を持つことを明らかにした。βサブユニットは191アミノ酸からなり推定2回膜貫通領域を持っていて、αサブユニットを修飾するタンパクであることがわかった。これらクローン化したrbsloチャネルcDNAをアフリカツメガエルの卵母細胞に注入してその機能を調べた結果、シングルチャネルコンダクタンスは約220pSで外向き整流性を持つこと、βサブユニットを共発現させたときには立ち上がり時間が早くなり不活性化が起こること、さらにCa感受性が増大してより負の電位でチャネルが活性化する事を明らかにした。

以上のように、本論文は骨格筋における種々のイオンチャネルを同定し、それらの性質を明らかにしたもので、筋生理学の分野に新しい知見を与えたものであり、博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。