



Title	アネキシン5で流動性を減少させた人工脂質二重膜中での脂質とイオンチャンネルの1分子観測
Author(s)	市川, 壮彦
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46744
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 いち かわ たけ ひこ
市 川 壮 彦

博士の専攻分野の名称 博 士 (工 学)

学 位 記 番 号 第 20414 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

基礎工学研究科機能創成専攻

学 位 論 文 名 アネキシン5で流動性を減少させた人工脂質二重膜中での脂質とイオン
チャンネルの1分子観測

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 柳田 敏雄

(副査)

教 授 若林 克三 教 授 村上富士夫

論 文 内 容 の 要 旨

イオンチャンネルは様々な神経疾患に関与しており、その開閉機構を明らかにすることは重要である。イオンチャンネルのゲーティング機構と構造変化の相関関係を明らかにするために本研究では、単一リアノジン受容体 (RyR) チャンネルとリアノジンの結合解離、並びに電流変化を同時に計測する測定系を構築した。RyR は筋細胞中の筋小胞体膜に存在する Ca^{2+} チャンネルであり、コンダクタンスが大きい高い S/N 比で電流を検出することができる。また、植物アルカロイドであるリアノジンの濃度に応じて様々なゲーティング応答を示すことが知られているので、構造-機能相関を調べるために有用である。

まず、人工脂質平面膜にチャンネル分子を組み込み、全反射顕微鏡を組み合わせた電気的・光学的同時測定系を開発した。ガラス表面をアガロースコートする方法と、チャンネルタンパク質を含んだベシクルを脂質平面膜近傍に吹き付ける膜融合法によって、初めて単一 RyR チャンネルの光学的・電気的同時測定に成功した。しかし、脂質二重膜中のチャンネル分子の拡散と蛍光色素の退色のために長時間の観察は困難で、チャンネル1分子とリガンド結合のキネティクス解析のためには、チャンネル分子を脂質二重膜中で不動化する必要があった。この問題を解決するために、本研究では膜結合タンパク質であるアネキシン5を用いる方法を試みた。アネキシン5が脂質二重膜の流動性にどのような影響を与えるかを調べるために、BODIPY 標識された脂質1分子と Cy5 標識した RyR1 分子の拡散を人工脂質二重膜中で直接観察した結果、アネキシン5は濃度依存的に1分子の拡散を減少させ、 $1\mu\text{M}$ のアネキシン5存在下では脂質、RyR とともに拡散係数が $1/200$ 以下に減少することがわかった。また、RyR の機能を電気生理学的に測定し、アネキシン5が RyR の機能に大きな影響を与えないことを明らかにした。これらの結果より、RyR を脂質二重膜中に固定するためにアネキシンが有用であることがわかった。チャンネルの構造-機能相関を調べるために、生体内条件でのイオンチャンネル同時計測系の構築、並びにチャンネルの固定化が大きな問題として残っていたが、本研究によってそれが解決したことになる。今後のチャンネル1分子キネティクス解析のために重要な一歩と考えられる。

論文審査の結果の要旨

イオンチャネルは様々な神経疾患に関与しており、その開閉機構を明らかにすることは重要である。イオンチャネルのゲーティング機構と構造変化の相関関係を明らかにするために本論文では、単一リアノジン受容体 (RyR) チャネルとリアノジンの結合解離、並びに電流変化を同時に計測する測定系を構築した。

まず、人工脂質平面膜にチャネル分子を組み込み、全反射顕微鏡を組み合わせた電氣的・光学的同時測定系を開発した。ガラス表面をアガロースコートする方法と、チャネルタンパク質を含んだベシクルを脂質平面膜近傍に吹き付ける膜融合法によって、初めて単一 RyR チャネルの光学的・電氣的同時測定に成功した。しかし、脂質二重膜中のチャネル分子の拡散と蛍光色素の退色のために長時間の観察は困難で、チャネル 1 分子とリガンド結合のキネティクス解析のためには、チャネル分子を脂質二重膜中で不動化する必要があった。この問題を解決するために、本研究では膜結合タンパク質であるアネキシン 5 を用いる方法を試みた。アネキシン 5 が脂質二重膜の流動性にどのような影響を与えるかを調べるために、BODIPY 標識された脂質 1 分子と Cy5 標識した RyR 1 分子の拡散を人工脂質二重膜中で直接観察した結果、アネキシン 5 は濃度依存的に 1 分子の拡散を減少させ、 $1\mu\text{M}$ のアネキシン 5 存在下では脂質、RyR ともに拡散係数が $1/200$ 以下に減少することがわかった。また、RyR の機能を電気生理学的に測定し、アネキシン 5 が RyR の機能に大きな影響を与えないことを明らかにした。これらの結果より、RyR を脂質二重膜中に固定するためにアネキシンが有用であることがわかった。

以上により、チャネルの構造-機能相関を調べるために、生体内条件でのイオンチャネル同時計測系の構築、並びにチャネルの固有化が大きな問題として残っていたが、本研究によってそれが解決したことになる。今後のチャネル 1 分子キネティクス解析のために重要な一歩であることは明白である。従って、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。