

学 位 論 文 題 名

チャネル特性のアルゴリズムと膜コレステロール
によるアロステリック制御

学位論文内容の要旨

緒言

膜は一種の熱流体力学的多因子-多相システムであるため、膜の場での反応の解析は複雑となる。一方、平面膜法は、膜の構成成分やイオンの組成などを単純化できる利点を有している。しかしながら、そのキネティクス解析に関しては現在のところ確立された方法はなく、またパッチクランプ法で使われるdwell解析をそのまま平面膜法に適用することは難しい。

本研究では、dwell解析に代わり、チャネルが膜の両面で2個会合したときにオープンするというグラミシジンのチャネル特性を生かし、その開閉頻度に焦点を当て解析する新しいアルゴリズムを確立した。またそこで得られた方法を用いて、膜コレステロールがチャネル開閉に与える影響を解析し、その幾つかの生理的意義を明らかにしたので報告する。

実験方法

平面膜の作成とチャネルの組込み

脂質平面膜法はMontalとMuellerらによって開発された二分子層膜法によった。

小孔（直径 100 μm ）を開けたテフロン薄膜で水槽を仕切り、その小孔より下に水面が来るように片側にそれぞれ50 mMと440 mM NaCl緩衝液（Hepes 25mMをTrisでpH 7.4となるように滴定した緩衝液）1440 μl を入れ、その上にヘキサンに溶かしたアソレクチン（10 mg/ml）15 μl を滴下すると、数分で溶媒が揮発し、リン脂質単分子層膜が形成される。その後、両水槽の水位を吸い上げると、小孔で単分子層膜が向き合い脂質二重層膜が形成される。

チャネル（メタノールに溶解、10 ng/ml）の膜への組込みは、水相にチャネルを直接添加（5~15 μl ）したのち膜を張る単層展開法によった。なお本実験では系の単純化のためにイオン組成はNaClのみとし、またその塩濃度（50 mMと440 mM）はヤリイカ巨大神経細胞の細胞内外の塩濃度とし、生理的に近い条件で行った。

また本研究ではアンプからの電位固定は行わず塩濃度の勾配のみでチャネルを

作動させ、電位によるノイズの軽減を計った。

実験結果

チャンネル波形解析法の検討

約10分間測定したチャンネル波形データを5秒間を1区間として区分けし、各区間毎のイベント数を計100区間カウントする。カウントの仕方はチャンネルがオープンした回数のみを問題とし、オープンしている持続時間は本研究では考慮しない。即ちシングルピークは1、段数のあるピークはそれぞれ段数に応じた回数とする。

次に、この分布表から頻度に関するヒストグラムを作成し、5秒間の平均頻度を算出する。同様の方法で種々の条件で得られたチャートからこの平均頻度を算出し、以下のチャンネル特性の解析に使用した。

温度による頻度分布パターンの変化

種々の温度で測定したチャンネル開閉の頻度に関するヒストグラムを作成すると、温度の上昇に応じて、平均頻度が高頻度側にシフトし、かつその移行の様子は次第に対称性を増す2項分布の形式に従った。このことは温度上昇に伴い、平面膜両面でのチャンネル分子の会合確率が次第に上昇していることを意味している。

次に、各温度での平均頻度を縦軸に再プロットすると、平均頻度は温度上昇に伴い指数関数的に増加した。このことはチャンネルオープンの平均頻度 (Y) は温度 (T) に関し、次の形で表現されることを示している (a、bは定数)。

$$Y = a e^{b T} \quad \dots \dots (1)$$

このようなチャンネルオープンの平均頻度の指数関数的上昇は平面膜にコレステロール (0.42 mol%) を導入しても同様であった。しかしながら膜コレステロールの導入により、チャンネルオープンは著しく抑制された。

次に、この指数関数の縦軸を対数で再プロットすると直線となり、そこから得られる一次式のy切片から式 (1) のa、傾きからbが求められる。この結果膜にコレステロールが存在しても、傾きは変えるが、y切片は変化させなかった。即ち膜コレステロールは式 (1) のaは変えずに、bのみを変化させることが明らかとなった。

チャンネル濃度変化の影響

グラミシジン濃度を変化させ同様の解析を行うと、傾きが等しくy切片のみが変化した。即ちグラミシジンは式 (1) の係数aのみを変化させ、bには関与しなかった。

以上、グラミシジンは式 (1) の係数aのみを、膜コレステロールは係数bのみを、それぞれ独立に変化させることが明らかとなった。

コレステロール濃度変化の影響

膜コレステロールの濃度を変化させ同様の解析を行うと、コレステロール濃度上昇に伴いチャンネルオープンの平均頻度は次第に抑制され、かつその変化はシグモイド状となった。このことは膜コレステロールがチャンネルオープンに対しアロ

ステリックに制御している可能性を示すものである。

次にこのシグモイド曲線のHillプロットをとると直線となり、この傾きとy切片からYとコレステロール濃度 (C) に関する次の関係式が得られる。

$$Y = \frac{3.0 \times C^{5.7}}{155.2 + C^{5.7}} \quad \dots (2)$$

(2) 式から得られた理論曲線は実験値と良く相関する (相関係数 0.97) ことから本式の妥当性が証明される。また、この曲線の変曲点でのコレステロール濃度は約0.42 mol%であった。

チャンネルオープンの平均頻度の予測式の導出と検証

まず、平均頻度 (Y) は温度 (T) に関し実験結果から式 (1) のように表現できた。

次に温度を一定としてコレステロール濃度 (C) を変化させると、(2) 式はそのシグモイド性からv、kおよびnを定数とすると次のように一般化できる。

$$Y = \frac{v \times C^n}{k + C^n} \quad \dots (3)$$

いま、ある一定温度 (α) と、ある一定のグラミシジン濃度のときの式 (1) のaを γ とおくと、式 (3) と式 (1) は等しいとおくことができ、この条件でのbが求められる。

$$b = \frac{1}{\alpha} \ln \left(\frac{v \times C^n}{\gamma (k + C^n)} \right) \quad \dots (4)$$

(4)式を(1)式に代入し

$$Y = a \times \left[\frac{v \times C^n}{\gamma (k + C^n)} \right]^{\frac{T}{\alpha}} \quad \dots (5)$$

いま(T,a)=(α, γ)とすると式 (3) となる。

一方、式 (1) のaはグラミシジン濃度 (m) の関数であり、 $a=e^{p(m)}$ とおける。従って (5) 式は

$$Y = e^{p(m)} \left[\frac{v \times C^n}{\gamma (k + C^n)} \right]^{\frac{T}{\alpha}} \quad \dots (6)$$

と表現され、チャンネルオープンの平均頻度の一般式が誘導される。

またこの式から得られる理論曲線は実験値とよい相関 (相関係数 0.95以上) を示すことから、本式の妥当性が証明される。

結語

1. チャンネルオープンの頻度分布を用いることにより、チャンネル特性を定量的に表現できるアルゴリズムを新たに確立した。
2. チャンネルオープンの平均頻度は温度の指数関数として表現され、その係数がチャンネルのグラミシジンに、累乗の指数が膜のコレステロールにより、それぞれ独立に支配されていることを明らかにした。
3. チャンネルシグナルの平均頻度は膜中のコレステロールにより濃度依存性に減少し、その変化のシグモイド性から、コレステロールはチャンネル特性をアロ

ステリックに制御している可能性を示した。

4. 一連のパラメータ評価実験から、反応温度、膜のコレステロール、及びチャネル濃度を含んだチャネルオープン平均頻度を算出する理論式を提示し、そこから得られる理論曲線が実験値と高い相関を示すことから、導出した理論式の妥当性を検証した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 菅 野 盛 夫

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

チャネル特性のアルゴリズムと膜コレステロール によるアロステリック制御

膜は一種の熱流体力学的多因子-多相システムであるため、膜の場での反応の解析は複雑となる。一方、平面膜法は、膜の構成成分やイオンの組成などを単純化できる利点を有している。しかしながら、そのキネティクス解析に関しては現在のところ確立された方法はなく、またパッチクランプ法で使われる dwell 解析をそのまま平面膜法に適用することは困難である。

本研究では、dwell 解析に代わり、チャネルが膜の両面で2個会合したときにオープンするというグラミシジンのチャネル特性を生かし、その開閉頻度に焦点を当て解析する新しいアルゴリズムを確立した。またそこで得られた方法を用いて、膜コレステロールがチャネル開閉に与える影響を解析し、(1) チャネルオープンの平均頻度は温度の指数関数として表現され、その係数がチャネルのグラミシジンに、累乗の指数が膜のコレステロールにより、それぞれ独立に支配されていることを明らかにした。(2) チャネルシグナルの平均頻度は膜中のコレステロールにより濃度依存性に減少し、その変化のシグモイド性から、コレステロールはチャネル特性をアロステリックに制御している可能性を示した。(3) 一連のパラメータ評価実験から、反応温度、膜のコレステロール、及びチャネル濃度を含んだチャネルオープン平均頻度を算出する理論式を提示し、そこから得られる理論曲線が実験値と高い相関を示すことから、導出した理論式の妥当性を検証した。

公開発表に際し、吉岡教授より変曲点近傍における理論式の単純化の可能性と全身麻酔薬におけるチャネル特性の解明について、菅野教授からはdwell解析法との比較、及び生理的条件下での実験についての質問があった。また、主査の石橋教授からは他のチャネル解析法と、そこから得られる情報の違いについての質問があった。これらの質問に対して申請者は明快に回答を行った。

本論文は、平面膜法における頻度解析法を創案し、膜コレステロールがチャネル特性をアロステリックに制御していることを明らかにしており、チャネル特性の新たな知見を見いだすことができる研究と期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。