

氏名	黒田 照夫
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬学
学位授与番号	博甲第1777号
学位授与の日付	平成10年3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題目	パッチクランプ法による細菌細胞のイオン輸送系の解析
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 大森 晋爾 教授 篠田 純男 教授 金澤 浩 教授 山田 秀徳

学位論文内容の要旨

海洋性細菌である腸炎ビブリオから遺伝子クローニングした Na^+/H^+ アンチポーター-NhaAの変異型NhaAを構築したところ、阻害剤アミロライドに対する耐性度が高くなっているものが存在した。変異を導入した領域には、アミロライドの結合及び Na^+ や Li^+ の認識部位などNhaAの機能に関わる残基が含まれていることが強く示唆された。

一方、細菌細胞のイオン輸送を直接測定し解析するために、パッチクランプ法の適用を試みた。まず、大腸菌を直径 $10\mu\text{m}$ 以上に巨大化させる方法を確立した。その巨大プロトプラストの内部に存在する液胞様構造体を分離精製し、この構造体が*in vivo*でつくられた巨大な反転膜小胞であることを示した。そしてこの液胞様構造体にパッチクランプ法を適用する事を可能にし、呼吸鎖と $\text{F}_0\text{F}_1\text{-ATPase}$ による H^+ 輸送を直接電流として測定することができた。さらに Na^+/H^+ アンチポーターの解析も試みた。

論文審査結果の要旨

細胞の膜には様々なイオン輸送系が存在し、細胞の機能においてそれぞれ重要な役割を担っている。イオン輸送系の解析には生化学的方法、遺伝学的方法、電気生理学的方法等の種々の方法が適用される。細菌細胞のイオン輸送系の解析には遺伝学的方法を駆使することができるが、電気生理学的方法の適用は難しい。一方、動物細胞のイオン輸送系やイオンチャネルの解析には電気生理学的方法を適用できるが遺伝学的方法の適用は困難である。

本研究は、細菌細胞のイオン輸送系についてまず生化学的および遺伝学的に解析し、さらにパッチクランプ法による電気生理学的解析を可能にすることを目指したものである。

細菌細胞は直径が約 $1\mu\text{m}$ と非常に小さく、直径約 $1\mu\text{m}$ の微小ガラス電極を細胞の膜面に固定ししかも電氣的に漏れが無いようにシールすることは不可能であり、従ってパッチクランプ法を細菌細胞に適用することは不可能であった。著者は大腸菌細胞から巨大プロトプラストを作成する方法を世界に先駆けて開発した(他大学のグループとの共同研究)。その方法で直径 $10\sim 30\mu\text{m}$ の巨大プロトプラストが作られた。そしてその巨大プロトプラストの中に直径 $10\sim 20\mu\text{m}$ の巨大ベジクルが出現した。著者は巨大プロトプラストと巨大ベジクルの構造と性質を解析し、両巨大構造体の膜はいずれも細胞質膜(内膜)からなっていることを明らかにした。また、タンパク質の分泌の方向性、呼吸鎖とFoF1-ATPaseによる H^+ 輸送の方向性の解析から、巨大ベジクルの膜は本来の細胞質膜に対して反転していることを明らかにした。著者はこの巨大ベジクルを用いてパッチクランプ法によるイオン輸送の測定を試み、世界で初めて、細菌細胞質膜におけるイオン輸送を微小電極により測定することに成功した。そして呼吸鎖による H^+ 輸送とFoF1-ATPaseによる H^+ 輸送の性質、阻害剤の影響について解析した。

この研究によりこれまで不可能であった細菌細胞膜のイオン輸送の電気生理学的解析が可能になると共に、イオン輸送系の性状に関するいくつかの新しい知見が得られた。この研究は学術上極めて価値あるものであり、博士の学位に値するものと判断する。