

興奮性膜のイオンチャネルの研究の最近の進歩

久木田 文 夫, 山 岸 俊 一

生理学研究所, 生体膜研究部門 〒 444 岡崎市明大寺町西郷中38番地
(1980年9月30日 受理)

Recent progress in studies on the ionic channels of the excitable membrane.

Fumio Kukita and Shunichi Yamagishi

National Institute for Physiological Sciences Okazaki, 444 Japan
(Received September 30, 1980)

Nerve excitation has been considered as the voltage- and time- dependent opening and closure of the Na and K channels. This can well explain macroscopic electro-physiological measurements results. Recent biochemical studies of Na and K channels show that the complete purification of their proteins and their incorporation into the artificial lipid bilayer membrane to form the active voltage-dependent ionic channels, will be accomplished in the near future. On the other hand, biophysical and physiological studies using intact nerve fibres have elucidated properties of single channels in the nerve membrane. Now we must increase effort to explain the nerve excitation, which is the macroscopic phenomenon, by distinguishing the microscopic nature of the single channel from the macroscopic nature of many channels activated during the nerve excitation.

1. はじめに

神経線維は感覚器で捉えた外界の情報を電気的なパルス (活動電位) の頻度の変化として脳などの中枢へ伝え, 中枢からの命令を効果器へ伝える役割を担っている。神経線維は単なる電線として働くのではなく, 生物組織のように絶縁性が悪く, 抵抗の高い電線では避けることのできない信号の減衰を常に増巾しながら一定の大きさに保つ働きをもっている。高等動物の有髄神経線維はミエリン鞘と呼ばれる絶縁性の高い多重膜で覆われているため, 信号の減衰は少なく, 神経線維上に一定間隔で跳び跳びに存在しているランヴェの絞輪, でのみ増巾されるので, 信号は神経膜の露出したランヴェの絞輪を跳び跳びに伝播するように見える (跳躍伝導)。このため有髄神経線維はミエ

リン鞘のない下等動物の無髄神経線維より高速で信号を伝播できる上, 脊髄や脳のように神経線維が束になって密に存在する場合でも神経線維間の干渉が少ないという利点をもっている。神経の信号伝播にとって重要な増巾作用を担っているのが神経膜であり, この興奮性という性質が神経線維のみならず, 脳などの神経系全体での重要な基本的な性質であり, この性質をもつ膜を興奮性膜と呼んでいる。

神経興奮の詳細な解析は Hodgkin と Huxley により始められ⁽¹⁾, それ以降神経興奮の現象論的な記述としては Hodgkin-Huxley のモデルが一般に受けいれられている。彼らは神経線維が内部はカリウムが多く外部はナトリウムが多いというイオン濃度差のエネルギーを利用し, 電気刺激に

より神経膜がはじめ Na イオンを透過し易くなり、次に K イオンを透過し易くなるのに応じて神経膜を隔てた細胞内外溶液間の電位差（膜電位）を一過性に負から正へ変化させ電氣的なパルスを発生することを確認した。フィードバック回路により人為的に膜電位を一定に保つと、神経興奮の際には一過性の内向き電流と定常的な外向き電流が観測される。内向き電流は Na イオンにより運ばれ、外向き電流は K イオンにより運ばれることを示した。それぞれのイオンを透過するイオンを透過するイオンチャネルは膜電位により決定される速度定数で開閉することを示し、実験により求められる速度定数や他の膜定数を用いて活動電位の形など神経興奮の諸性質を定量的に説明した。

このモデルから予測される Na イオンや K イオンを選択的に透過するイオンチャネルの実体について詳細な研究が行われてきている。本稿では興奮性膜のイオンチャネルに関する最近の生理学、生物物理学及び生化学の研究を紹介することにする。

神経膜は脂質二重層でできた、厚さ 100Å 足らずの薄膜に蛋白質で出来たイオンチャネルが膜を貫いて埋めこまれているような構造をもっていると想像されている⁽⁸⁾。神経膜が脂質二重層膜に比して、千倍以上も高い膜コンダクタンスをもつこと、脂質二重層膜にポリペプチドで出来た人工的なイオンチャネルを埋めこんでやると膜コンダクタンスが上昇し、神経膜の性質の一部を模することが出来ることから親水性のイオンチャネルが予想されたのである。

イオンチャネルが膜面上に疎らに存在するということが、ごく少量のフグ毒 (TTX)、二枚貝の毒 (STX) による Na チャネルの選択的阻害及び TTX や STX の神経膜への結合量の実験から明らかになり、又 K チャネルが 4 級アンモニウムイオン (TEA など) で特異的に阻害されることから Na チャネルと K チャネルが独立に存在することが示唆された。これらの点に対する生理学的研究が数多く行われるとともに、最近ではイオンチャネルを構成する蛋白質を興奮性膜から抽出しようという試みも行われたり、膜面に多数存在するイオンチャネルの微視的な単一チャネルとしての

性質の研究も行われ、多数のチャネルの巨視的な振舞である興奮との関係も新たな興味をもたれつつある。以下実験事実を紹介しつつ、議論を進めていきたい。

2. 神経膜におけるイオンチャネルの密度

神経膜の興奮は非常に低濃度 (数 10 nM) の TTX や STX により抑制される。TTX や STX は Na イオンを K イオンに対して透過し易い Na チャネルの活性を抑えるために、Na チャネルを流れる電流成分が消失する。TTX の神経膜への結合の速度論的研究から TTX と Na チャネルは 1 : 1 に結合することが示唆される⁽⁴⁾⁽⁵⁾ ので、³H でラベルした TTX や STX の神経膜への結合量を測定することにより Na チャネルの神経膜上の密度を測定することができる。このようにして求められた Na チャネルの種々の組織の膜上の密度は表 1 に示すとおりである⁽⁶⁾。1 μm^2 の膜に数十～数百個であり、チャネル間の平均距離は 1000Å 前後で膜の厚さに比して非常に疎らに分布していることが分かる。電気ウナギの発電器官の膜や有髄神経のランヴィエ絞輪の膜のように Na 電流の密度の高い膜では、Na チャネルの密度も高い。

イオンチャネルの密度を膜電流の“ゆらぎ”から求める雑音解析も神経膜の研究に用いられている。⁽⁷⁾ それによるとイカの巨大神経膜で Na チャネル密度が 330 μm^{-2} 、K チャネルの密度が 60～70 μm^{-2} であり、⁽⁸⁾ 蛙の有髄神経のランヴィエ絞輪では Na チャネルの密度が 2000 μm^{-2} である。⁽⁹⁾ これらの値は TTX や STX の結合量から求めた値とはほぼ等しい。

イオンチャネルの密度が分かると、単一のイオンチャネルのコンダクタンスを知ることができる。イカ巨大神経膜、蛙の有髄神経膜や筋膜ではどれも数 pS である。この値は 1 ms に数千個のイオンが、チャネルを通過することに対応しており、膜コンダクタンスの温度依存性が少ない点とともにイオンチャネルが親水性の細孔であり、⁽⁹⁾ イオンのキャリアではないと考える根拠である。

Na チャネルと K チャネルの密度が異なることは二つのチャネルが独立に存在していることを改めて示唆している。

Table 1. STX binding to excitable tissues. The Na channel densities can be calculated from the maximal saturatable binding capacity (M) and the surface area of excitable membranes. The equilibrium dissociation constants (K) were roughly equal in all tissues (6).

STX BINDING TO EXCITABLE TISSUE			
	K (nM)	M (f-mole/mg ⁻¹)	Channels per μm^2
Nfrve			
Non-myelinated			
rabbit	1.8	110	110
lobster	8.5	94	90
garfish	9.8	377	35
squid (<i>forbesi</i>)	—	—	550
squid (<i>pealii</i>)	3.8	—	170
Myelinated			
frog	5.3	3.1	2000
rabbit	1.3	17	12000
Muscle			
Sartorius			
<i>R. temporaria</i>	5.0	22	380
<i>R. pipens</i> (S)	4.3	26	340
<i>R. pipens</i> (N)	3.8	15	200
Diaphragm			
rat (normal)	3.8	24	210
rat (denrvated)	4.2	16	—

3. チャネル蛋白質の単離と精製

電気生理学的測定と TTX の結合量から求めた Na チャネルの密度が同じ値を与えることから、TTX と Na チャネルは 1 : 1 に結合することが明らかになった。Na チャネルに蛋白質分解酵素を作用させると TTX の結合が抑えられること⁽⁶⁾、細胞内に蛋白質分解酵素を作用させると Na チャネルが開いたままになる (Na チャネルの不活性化過程の消出)⁽⁶⁾ ことから蛋白質が Na チャネルの重要な構成要素であることは明らかである。Na チャネルを構成する蛋白質は TTX や STX が結合する部分、Batrachotoxin, Veratridine や Grayanotoxin などの脂溶性の神経毒が結合し Na チャネルを開いたままにする部分、サソリ毒やイソギンチャク毒が結合する部分をもっと考えられ⁽⁶⁾、これらの神経毒が特異的に結合する膜蛋白質を神経毒の結合活性をもった状態で単離精製することが神経膜から Na チャネルを生化学的に単離することの第一歩である。

TTX 結合蛋白質の最初の単離は界面活性剤 Na-cholate や Triton X-100 を用いて、garfish の

嗅覚神経から Henderson ら⁽⁶⁾ により試みられたが、単離した蛋白質は不安定で生化学的な解析や精製を進めることは不可能であった。

Agnew ら⁽⁶⁾ は非イオン性の界面活性剤である Lubrol-PX に生体膜の主要な成分であるリン脂質を僅かに加える (15 : 1 が最適) とともに、TTX を予め多量に加え、結合部位に TTX が結合した状態で結合部位を保護し、Na チャネル密度の高い電気ウナギの発電器官から、TTX 結合蛋白質を可溶化し、イオン交換クロマトグラフィー (DEAE-Sephadex column) で精製を進めることに成功した (Table 2)。彼らによると Sepharose 6B によるゲル濾過法で調べた分子量が 230,000 で stokes 半径が 95 Å (沈降係数 8 S) である。活性の一番高い分画で TTX 結合の比活性が 50% (約 2000 pmol TTX/mg of protein) になるまで精製を進めることができた。この分画は SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分子量 46,000, 59,000 と 300,000 の三つのポリペプチドからなることが分った。

Barchi ら⁽⁶⁾⁽⁶⁾ は Na チャネルの密度の低いラッ

Table 2. Purification of the TTX binding component *Electrophorus electricus* electroplax membranes. The specific activity (pmol of [³H] TTX bound per mg of protein) increased through the purification procedure, in spite of the large loss of the total binding activity (13).

Purification of the TTX-binding component				
Step	[³ H]TTX bound, pmol	Protein, mg	Specific activity*	% initial binding activity
1% Lubrol				
extract	4290	311	13.8	100
DEAE-Sephadex	2630	11.5	229	61.3
Amicon				
concentrate	2020	7.0	288	47.0
Sepharose 6B column I				
Total	1770			41.2
Tube 16	107	0.0694	1540	
Tube 17	172	0.106	1620	
Tube 18	225	0.112	2010	
Tube 19	233	0.120	1950	
Tube 20	179	0.130	1370	
Sepharose 6B column II				
Totl	1133			26.4
Tube 12	22.2	0.0128	1730	
Tube 13	22.7	0.0129	2160	
Tube 14	34.7	0.0163	2130	
Tube 15	29.3	0.0163	1800	
Tube 16	24.9	0.0085	2930	

トの骨格筋の細胞膜からSTXの結合蛋白質をAgnewらの方法と麦芽アグルチニン(WGA)を用いた糖蛋白質のアフィニティークロマトグラフィーを用いることにより単離精製した。STXの結合量が1500 pmol STX/mg of protein となるまで精製を進め、蔗糖密度勾配法により求めた結合蛋白質の沈降係数は9.9Sであった。又SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で53,000, 60,000と64,000の三つのポリペプチドからなることが分った。(Fig. 1)

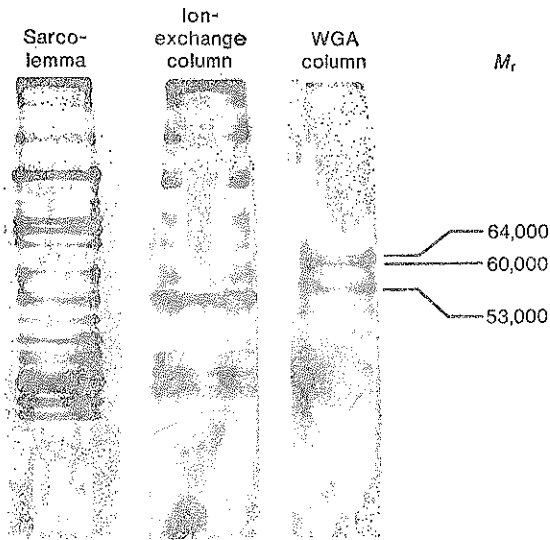


Fig. 1. Gradient SDS polyacrylamide gel electrophoresis of rat sarcolemmal fraction, Saxitoxin-binding component (SBC) containing peak from the ion-exchange column, and purified SBC after elution from a WGA-Sepharose column. The final SBC peak contains only three major bands, of $M_r \approx 53,000$, 60,000 and 64,000, compared to the 40-50 bands usually seen in the starting material. (14)

Beneski ら⁽⁹⁾は株化された神経芽細胞腫由来の培養細胞に ^{125}I でラベルしたサソリ毒を光化学的修飾法で膜蛋白質に共有結合させることにより、Naチャンネルの有無及びNaチャンネルの分子量を調べた。膜電位感受性のNaチャンネルをもった細胞では分子量250,000と32,000のポリペプチドがラベルされることがSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分った。ラベルしていないサソリ毒や膜電位の脱分極により、 ^{125}I のラベル化が阻害されること、非興奮性の細胞では上述のポリペプチドがラベルされないことから、膜電位感受性のNaチ

ャネルのみ ^{125}I ラベルして、分子量を求めることができたことを示した。又ラットの脳のシナプス膜標本でも分子量250,000と32,000のポリペプチドがラベルされることが分った。

同じような試みは、予備的なものであるが、種々の興奮性膜や神経毒を用いて行われている。Vincent ら⁽¹⁰⁾は ^{125}I ラベルしたイソギンチャク毒(II)の結合をラットの脳のシナプトゾームで調べ、Gitschier ら⁽¹¹⁾はSTXの結合をショウジョウバエの頭の抽出物で調べた。

Kチャンネルの研究はNaチャンネル程進んでいないが、Hucho ら⁽¹²⁾はKチャンネルを特異的に阻害するTEAを光化学修飾法でザリガニの神経膜の膜蛋白質に共有結合し、Triton Xで抽出後、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動法で調べ、脂質より僅かに遅く泳動する、光化学修飾された分子量の小さな蛋白質が存在することを示し、膜電位依存性のKチャンネルをもたないシビレエイの発電器官のシナプス後膜にはそのような膜蛋白質は存在しないと報告した。

Caチャンネルは原生動物ゾウリムシのセン毛に多量に存在すると考えられているが⁽¹³⁾、セン毛の細胞膜のみを集め、その膜蛋白質の生化学的な研究が二次元電気泳動法等を用いて始められている⁽¹⁴⁾。

チャンネル蛋白質の生化学的な研究はチャンネルの生理的活性を阻害する神経毒の結合蛋白質を単離する以外に方法はなく、単離したチャンネル蛋白質として、そのままの状態調べられるのは神経毒の結合活性のみであり、膜電位の依存して開閉するチャンネル蛋白質の本来の活性があるか、チャンネルの実質部分を単離できたかどうかを確認するためには、人工の脂質膜に単離した蛋白質を埋めこんで膜電位感受性の膜コンダクタンスの変化を調べる必要がある。現在のところ、単離された神経毒結合蛋白質はいくつかのサブユニットからなり、脂質膜を貫通してイオンの通るような穴が両端に通じているというイオンチャンネルを形成するのに十分な大きさをもっていると言える。

4. 興奮性膜の再構成

膜電位感受性のNaチャンネルの再構成の手始め

として, Veratridine (VT) や Batrachotoxin (B TX) で開き, TTX により阻害される Veratridine 活性化チャネルの再構成が Villegas らにより試みられている。彼らは先ず, イセエビの歩脚の神経線維束から神経膜だけからなる袋状の膜片(完全にシールされている)を調整し, この膜小胞に ^{22}Na を予め取りこませ, その透過性を測定し, VTやGTXでNaの透過性が増し, TTXで増加が抑えられることを確認した²³⁾。この膜標本を -70°C で凍結すると常温にもどしても, 膜標本は電子顕微鏡で見た構造が不規則に破壊されており, Naの透過性の活性化もTTXによる阻害も見られない。このような crude な膜蛋白質標本に人工のリン脂質を加えて, 超音波処理等で人工的な膜小胞(リポゾム)を作ると, 膜蛋白質はリポゾムに取りこまれていることが分かる。膜蛋白質を取りこんだ, リポゾムではNa透過性のVTやGTXによる活性化やTTXによる阻害が見られ, この変化は取りこまれた膜蛋白質の量に比例する²⁴⁾。最初の膜蛋白質標本を界面活性剤 Na-cholate と octylglucoside で可溶化し, 膜蛋白質のみを集め, このより精製された膜蛋白質標本を用いて, 同じような再構成を試みると, ^{22}Na の取りこみ量で測定したNaの透過性のVTやGTXによる増加とTTXによる阻害が認められた (Fig. 2)²⁴⁾。又膜蛋白質標本を 50°C で10-15分熱処理すると再構成したりポゾムは活性を示さないことが分った。膜蛋白質標本の中にNaチャネル蛋白質が含まれており, それが脂質二重層膜に取りこまれ, Naチャネルの活性を示したのは明らかであるが, Naチャネル蛋白質の精製を進め, 再構成したNaチャネルの活性を高めることが必要である。

松本らは Tasaki により提唱された細胞内陰イオンの神経興奮性維持の好適度の順序 $\text{F}^{-} \gg \text{glutamate} \gg \text{Cl}^{-} \gg \text{Br}^{-} \gg \text{I}^{-}$ ²⁵⁾ はチューブリンが微小管を形成し易い条件と一致すること, イオン強度や2価イオンなどの条件も興奮性維持と微小管形成で一致すること, コルヒチン, ビンブラスチンやポドフィロトキシンなどの微小管を壊わして細胞分裂を阻害する試薬を加えると神経興奮の閾値が上昇し, 活動電位の大きさが減少することなどを確

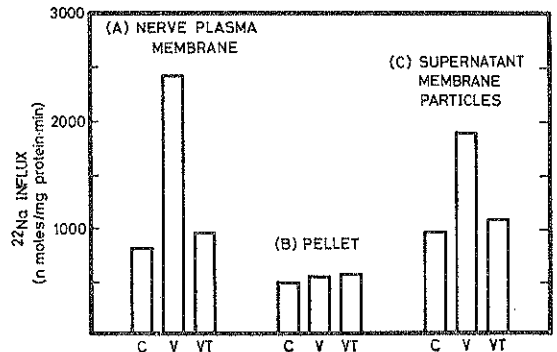


Fig. 2. ^{22}Na influx into vesicles reconstituted with nerve membrane of fractions obtained by detergent treatment. ^{22}Na flux into vesicles reconstituted by the freeze-thaw-sonication (30 sec) procedure with soybean lipids and (A) lobster nerve membrane, (B) pellet fraction obtained after treatment of the membrane suspended in 0.78 M sucrose, 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, with detergents (0.25% cholate and 30 mM octylglucoside) and centrifugation at 150,000 X g for 20 min, or (C) particulate material pelleted from the supernatant after 24-fold dilution with 10 mM Tris-Cl, pH 7.5, and further centrifugation at 150,000 X g for 30 min. For each set the ^{22}Na influx was measured in a control sample C, another treated with 0.5 mM veratridine, V, and a sample treated with 0.5 mM veratridine plus 100 nM tetrodotoxin VT. Influx measurements were made 30 sec after addition of ^{22}Na . (24)

めた²⁶⁾。又イカの神経膜近傍の原形質に微小管が存在することを電子顕微鏡で観察し²⁷⁾, イカ神経の原形質から抽出したチューブリンがin vitroで重合することを確めた²⁸⁾。これらの結果から彼らは細胞膜の裏打ち構造が神経興奮性維持に重要であると考え²⁹⁾, ビンブラスチンなどを細胞内に灌流して, 興奮性を消失させたイカ巨大神経の細胞内にチューブリン, チューブリンの重合を制御する分子量300,000~400,000の高分子量成分 (HMW), チューブリンチロシンリガーゼ, チロシン, ATP, Mg^{2+} , c-AMP を細胞内に灌流して数10分後に興奮性の著しい回復が見られることを示した³⁰⁾。彼らは微小管がチャネル蛋白質同志の空間的相互作用に関係しているのではないかと考えている³¹⁾が, 微小管とチャネル蛋白質の関係は今のところ不明であり, 細胞内の裏打ち構造がチャネルが正常に働く場を提供していると考えられるほうが良いであろう。

神経膜のチャネルのような膜電位感受性のイオンチャネルではないが, 再構成のより進んでいる

アセチルコリン受容体 (AcChoR) 膜のイオンチャネルについての最近の報告を以下に述べる。

シナプス後膜や筋肉の神経筋接合部の膜等にある AcChoR は単離・精製でき、脂質二重膜に埋めこんで、アセチルコリン (AcCho) やその類似物カルバミリコリン (CbmCho) よりイオンチャネルの活性を調べることができる。AcChoR はそれに特異的、不可逆的に結合する蛇毒 α -Bungartoxin (α -BTX) を用いたアフィニティクロマトグラフィーを用いて完全に精製され、 α -BTX の結合部位 α サブユニット (分子量40,000), β (分子量50,000), γ (分子量60,000) と δ (分子量64,000) のサブユニットが $\alpha^2\beta\gamma\delta$ のような量比で複合体を作っている膜蛋白質であることが分っている²⁸⁾。Nelson ら²⁹⁾ はシビレエイの発電器官より単離・精製した純粋の AcChoR 蛋白質を平面状に張った脂質二重膜 (黒膜と呼ばれることもある) に埋めこみ、CbmCho によるイオンチャネルの開閉を膜電流を測定することにより詳しく

解析した。本来の発電器官の受容体と同様の薬理的特異性、AcCho による開閉等の性質を示すこと (Fig. 3), 単一チャネルの膜電流の測定から単一チャネルのコンダクタンスが 16 pS (0.1 M NaCl 中で), 開いている時間が 35ms であり、本来の膜のイオンチャネルと同程度の値をもつことを示した。

Gonzalez-Ros ら³⁰⁾ は同じく完全に精製された AcChoR 蛋白質を発電器官の脂質で作ったリポゾームに埋めこんで、AcCho により増大する Na の透過性を測定し、本来の発電器官の膜片から作った膜小胞と同様の性質を再構成膜がもっていることを示した。

これらの結果は AcChoR 蛋白質の一部が脂質二重層膜に埋めこまれて、イオンチャネルとして働くことを意味しているが、どのサブユニットがイオンチャネルなのかは不明である。AcChoR 蛋白質の単離・精製が Na, K チャネル蛋白質の単離・精製より進んでいる理由は、TTXが可逆

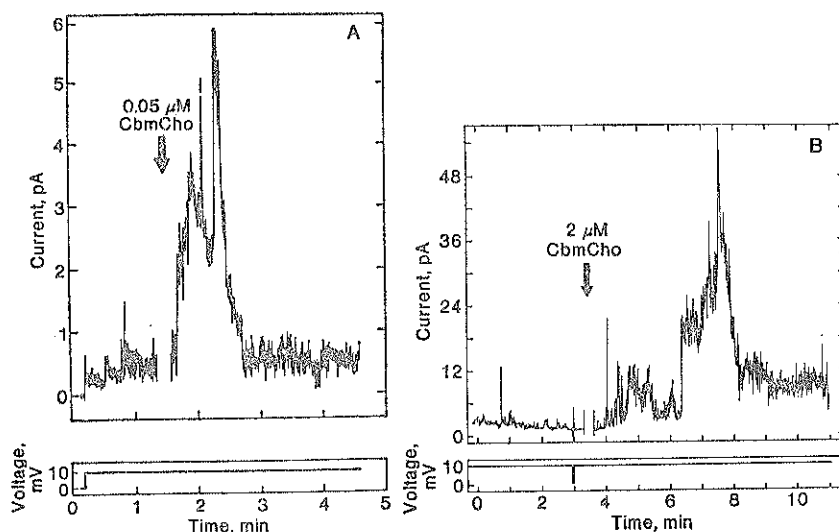


Fig. 3. Time course of the Charbamylcholine (CbmCho)-induced conductance increase obtained from purified Acetylcholine Receptor (AcChoR) incorporated in symmetric planar lipid bilayers. A voltage step of 10 mV, positive in the side of CbmCho addition, was applied across the membrane and held constant throughout the record as shown in the lower trace. The current flowing across the bilayer in response to the applied voltage is displayed in the upper trace. The arrow indicates the time at which CbmCho was added. Samples (10ml) of the concentrated solution were added to final CbmCho concentration of 0.05 mM (A) or 2mM (B) and mixed by five up-and-down strokes of the Pipetman pipetter. The electrical artifact introduced by the stirring maneuver was deleted from the record as indicated by the interruption in the trace. (31)

的に結合する低分子であるのに反し、 α -BTX は不可逆的に結合する蛋白質であるため、アフィニティークロマトグラフィーによる精製が容易であった点、AcCho の結合という本来の活性を直接測定できた点にあると思う。

AcCho R と同じように、完全に精製された Na, K チャネル蛋白質を平面状に張った脂質二重層膜に埋めこんで、膜電位依存性のチャネルの開閉を調べるのが今後の課題である。

5. 単一チャネルの電流

神経興奮は沢山のチャネルが開閉する巨視的な現象であることは、膜電流の“ゆらぎ”の測定から分っていたが、単一のチャネルを通過する電流を直接測定することには成功していなかった。これはまず、蛋白質分解酵素で膜表面の結合組織を取り除いた蛙の除神経筋の終板部外（神経が筋肉が付着している部分以外）の AcChoR にともなうイオンチャネルで測定に成功した³³⁾。微小な内径数 μm のガラスのピペット電極に低濃度のアゴニスト (AcCho, CbmCho など) を満たし、筋膜の外側に押しつけ、その部分の膜電位を制御して微小領域 (patch) の膜電流を測定し、単一チャネルを通る電流だと思われる矩形波状の数 pA という微小な電流を観察できた。

Conti ら³⁴⁾ は TTX を加えた、高 K^+ 浴液中で K チャネルのみ働くようにしたイカ巨大神経の細胞内から、内径 $1\sim 2\mu\text{m}$ の L 字型のガラス電極を膜内面に押しあて、細胞内液のイオン濃度を下げガラス電極の壁と細胞膜間の絶縁抵抗を高くして、微小領域を通る膜電流のみを測定した。外液の K 濃度が高く、内液の K 濃度が低い条件下で $+50\sim +70\text{mV}$ ある静止膜電位を、別の電極で膜電位制御することにより過分極（より負）にして活性化された K チャネルの数を減らし、単一チャネルの開閉に対応した 2pA 以下の矩形波状の電流変化を記録できた (Fig. 4) 単一チャネルのコンダクタンスはオームの法則に従うとすると 17.5pS となり、膜電流の“ゆらぎ”より求めた値より大きい。単一チャネルが定電場の法則に従い、電位差に対して指数関数的なコンダクタンス変化をしないと仮定して、生理的なイオン条件下での値に換算すると $9\sim 11\text{pS}$ となり、“ゆらぎ”より求めた値

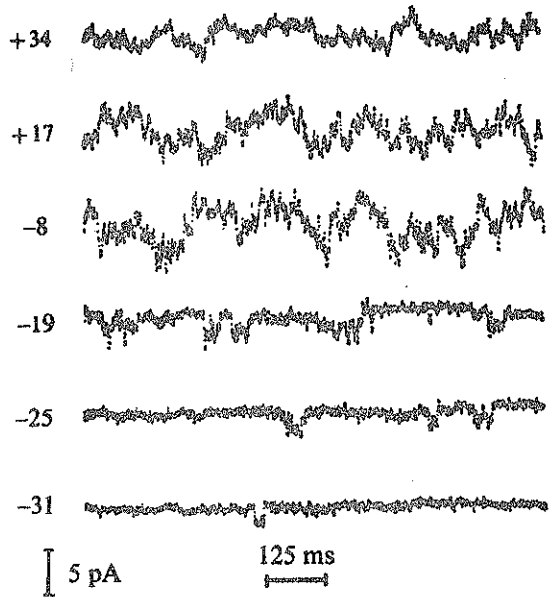


Fig. 4. Recordings of the patch current at different membrane potentials (as indicated in mV). Temperature, 5.5°C , pipette resistance before approaching the membrane, $100\text{M}\Omega$, after approach, $280\text{M}\Omega$. (34)

に近くなる。この patch 電流の頻度は膜電位を脱分極させると増加する。同様の電流は Na チャネルでも測定され Hodgkin-Huxley のモデルに従うような確率で発生することが培養したラットの筋細胞で確かめられた³⁵⁾。

このような単一チャネルによる電流はチャネルの密度を少なくすることのできる人工膜上のチャネルでは容易に測定できるが³⁶⁾、神経膜では過分極にすることにより、AcCho R 膜ではアゴニストの濃度を低くし活性化されるチャネルの数を減少させて、しかも微小領域の電流のみ測定して成功した。これらの結果は、イオンチャネルが人工膜上と同様に神経膜上に疎らに分布していることを示している。

6. イオンチャネルの大きさ

イオンチャネルの大きさについては Hille ら^{37,38)} のモデルがある。彼らは蛙の有髄神経膜の Na チャネルと K チャネルに対する金属イオン及び有機イオンの透過性を、活動電位の大きさに対応する Na チャネルを通る電流の逆転電位* (Na 電位) 及び K チャネルを通る電流の逆転電位 (K 電位)

* 膜電位を一定に制御したときに流れる膜電流の方向が逆転する時の膜電位

の大きさの測定値から Nernst の式を用いて算出した。Na チャネルの大きさとしては外液の Na イオンの代りに用いると、ごく小さな活動電位を発生させる、Na イオンに対する相対的な透過性が 0.13 であるグアニジウムイオンの大きさより、やや大きい $3.1 \times 5.1 \text{ \AA}$ が最小の大きさで、K チャネルの大きさはアンモニアイオンよりやや大きな $3.3 \times 3.3 \text{ \AA}$ ⁶⁰⁾ と考えた。筋膜の神経終末部のイオンチャネルは $6.5 \times 6.5 \text{ \AA}$ と報告した⁶⁰⁾。彼らの方法はイオン種を変化させ、神経興奮の大きさが小さくなることに基いている点、特別なイオンを用いたために興奮性が小さくなること⁶⁰⁾を考慮する必要がある。又彼らが述べているように、この方法ではイオンチャネルの一番細い部分すなわちイオン選択性フィルターの大きさを求めていることになる。

筆者らは活動電位の大きさは変えずに、膜電流の大きさ及び膜コンダクタンスを減少させる、本来神経興奮にとって重要な役割を演じていない非電解質の効果を詳細に調べた。Na 電流及び K 電流を阻止する能力は非電解質分子の大きさや形に依存することを確認した⁶⁰⁾。細胞外と細胞内に性質の異なる非電解質を加えると、活動電位の形は両側に同種類の非電解質を加えたときに比べ、立ち上がり相又は立ち下がり相の一方が極端に変化する⁶⁰⁾。(Fig. 5) これは非電解質の種類により膜電流の阻止能が異なるためで、詳しい解析の結果、チャネル細孔の出入口ではグルコースや蔗糖分子の阻止能はグリセチン分子より大きい、グリセリン分子はチャネル細孔内にはいりこみ細孔のコンダクタンスを低下させると結論した⁶⁰⁾。すなわち Na チャネルや K チャネルの細孔は Hille らの結果より大きな直径 $5.5 \text{ \AA}$ 以上の大きさをもつことを示している。同様な現象は脂質二重層膜に埋めこんだアラメチンチャネルでも見られ⁶⁰⁾、Na, K チャネルがアラメチンチャネルと同じような親水性の細孔であることを示唆している。

7. 単一チャネルと巨視的性質

膜興奮で興味あることの一つは、膜電位が変化すると、それに依存した速度定数でチャネルが開閉し、開いているチャネルの数が増えることで

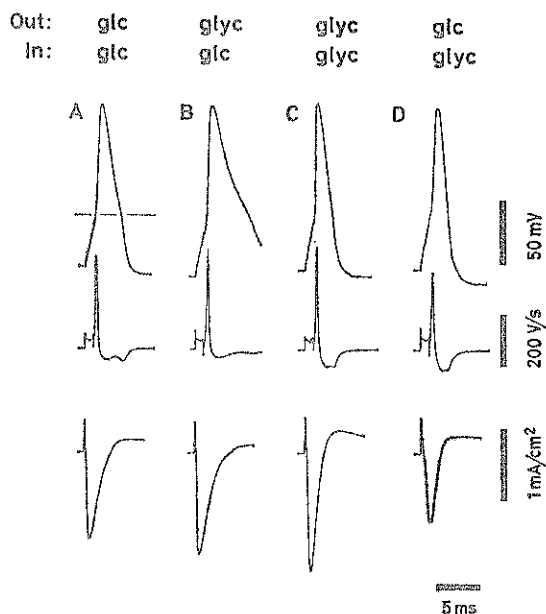


Fig. 5. Action potentials, their derivative and the membrane currents at the clamping voltage 70 mV. The holding potential was 60 mV. Four pairs of the internal and external solutions were used. External solutions were glucose (glc) solutions (A and D) and glycerol (glyc) solutions (B and C). Internal solutions were glucose solutions (A and B) and glycerol solutions (C and D). Concentrations of glycerol outside and inside (in M) were 2.43 and 3.58, and those of glucose were 1.56 and 2.30, respectively. Asymmetrical changes in the shape of the action potential could be explained by the change in the membrane currents. The membrane current flowing from the glucose side to the glycerol side was suppressed more than that flowing in the opposite direction. This was due to the large suppression by glucose at the mouth of the channel pore than glycerol and the increase in the resistance of the channel pore by glycerol. (39)

ある。膜電位を脱分極するに伴い、単一チャネルの開く確率が上昇することは Conti らの単一 K チャネルの電流測定⁶⁰⁾で示されたが、チャネルの開閉は膜電位によって決まる確率で起こり⁶⁰⁾、この確率が巨視的な Hodgkin と Huxley の式に従って時間変化することが Sigworth らにより示された⁶⁰⁾。

筆者らは溶液の微視的な粘性を非電解質を加え増加させると、神経興奮の時間経過が緩やかになること及び膜電流が溶液の微視的な粘性の増加による溶液の比抵抗の増加で説明できる以上に小さくなることを示した。この結果から単一チャネルの開いている時間及びコンダクタンス及び一回の興奮で開くチャネルの総数は変化しないで、単位時

間に開く確率が減少し、全体の時間経過が長びくという仮説の下に研究を進めている⁽⁴⁰⁾。いずれにせよ、チャンネル開閉の確率の変化がチャンネル同志のどのような相互作用、又はチャンネルを支えている脂質膜などの性質で起こるのかを明らかにするのは今後の課題であり、前述の松本ら⁽⁴⁰⁾は微小管を介した相互作用を期待している。

チャンネルが巨視的な振舞を始める前に、膜電位の変化をチャンネル自身が感じ、確率を決める仮想的なゲーティング粒子の再配列が起こると Hodgkin と Huxley は考えた⁽⁴¹⁾。この再配列により流れる電流をゲーティング電流と名付け、脱分極方向と過分極方向の容量性電流の差がこの電流であるとした⁽⁴²⁾。仮想的な粒子の実体は明らかでないが、イオンチャンネルの構成部分である電気奴極子等が膜電位変化により変形を起こし、次にイオンチャンネルの開閉が起こるものと思われる。

8. 終りに

神経膜のイオンチャンネルの研究は巨視的な測定からの推定に過ぎなかったが、最近のチャンネル蛋白質の単離・精製及び活性をもったイオンチャンネルの再構成の研究により、徐々に神経膜も既知の分子により、構成されている分子機械として理解することが可能となりつつある。複雑な生物の反応がそれぞれ蛋白質、脂質及び糖質などの種類や配列の仕方によって説明できるということは最近の分子生物学の基本的な考え方であるが、細胞膜の機能においてはイオンチャンネルの平面的な配列が特に重要な意味をもち、神経興奮の研究におけるように単一チャンネルの性質と単一チャンネル同志の相互作用から膜全体の巨視的な性質を理解することは構造を重視した分子生物学の一つの試みである。神経膜の研究も含め、生命現象を分子機械として理解することは人工的な細胞の形成の可能性もさることながら、病変した欠陥ある細胞・組織の性質の理解及びその治療への道を開くものである。

文 献

- (1) A. L. Hodgkin: The conduction of the nerve impulse. Charles C. Thomas, Springfield (Ill.) 1964.
- (2) R. D. Keynes: Nature (London) **239** (1972) 29.
- (3) T. Narahashi, J. W. Moore and W. R. Scott: J. Gen. Physiol. **47** (1964) 965.
- (4) L. A. Cuervo and W. J. Adelman Jr.: J. Gen. Physiol. **55** (1970) 309.
- (5) J. R. Schwarz, W. Ulbricht and H. H. Wagner: J. Physiol. (London) **233** (1970) 167.
- (6) J. M. Ritchie: Brain Research Bulletin. **4** (1979) 181.
- (7) F. Conti: Quarterly Review of Biophysics. **8** (1975) 451.
- (8) F. Conti, L. J. De Felice and E. Wanke: J. Physiol. (London). **248** (1975) 45.
- (9) F. Conti, B. Hille, B. Neumcke, W. Nonner and R. Stämpfli: J. Physiol. (London), **262** (1976) 729.
- (10) T. Benzer and M. A. Raftery: Proc. Nat. Acad. Sci. USA. **69** (1972) 3634.
- (11) C. M. Armstrong, F. Bezanilla and E. Rojas: J. Gen. Physiol. **62** (1973) 375.
- (12) R. Henderson and J. H. Wang: Biochemistry **11** (1972) 4565.
- (13) W. S. Agnew, S. R. Levinson, J. S. Brabson and M. A. Raftery: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75** (1978) 2606.
- (14) R. L. Barchi, S. A. Cohen and L. E. Murphy: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** (1980) 1306.
- (15) R. L. Branchi and L. E. Murphy: Biochim. Biophys. Acta **597** (1980) 391.
- (16) D. A. Beneski and W. A. Catterall: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** (1980) 639.
- (17) J. P. Vincent, M. Balerna, J. Barhanin, M. Fosset and M. Lazdunski: Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77** (1980) 1646.
- (18) J. Gitschier, G. R. Strichartz and L. M. Hall: Biochim. Biophys. Acta **595** (1980) 291.
- (19) F. Hucho: Nature (London). **267** (1977) 719.
- (20) K. Dunlap: J. Physiol (London): **271** (1977) 119.
- (21) A. Adoutte, R. Ramanathan, R. M. Lewis, R. R. Dute, K. Ling, C. Kung and L. D. Nelson: J. Cell Biol. **84** (1980) 717.
- (22) F. V. Barnola and R. Villegas: J. Gen. Physiol. **67** (1976) 81.
- (23) R. Villegas, G. M. Villegas, F. V. Barnola and E. Racke: Advances in Cytopharmacol. **3** (1979)

- p. 373.
- ②4 R. Villegas and G. M. Villegas: Nerve Membrane- Biochemistry and Function of Channel Proteins-. (ed. G. Matsumoto et al) Univ. Tokyo Press, Tokyo (1981).
 - ②5 I. Tasaki: Nerve excitation. A macromolecular approach. Charles C. Thomas, Springfield (Ill.) (1968).
 - ②6 G. Matsumoto and H. Sakai. J. Membrane Biol. 50 (1979) 1.
 - ②7 S. Endo, H. Sakai and G. Matsumoto: Cell Structure and Function. 4 (1979) 285.
 - ②8 H. Sakai and G. Matsumoto: J. Biochem. 83 (1978) 1413.
 - ②9 G. Matsumoto and H. Sakai: J. Membrane Biol. 50 (1979) 15.
 - ③0 J. A. Reynolds and A. Karlin: Biochemistry 17 (1978) 2035.
 - ③1 N. Nelson, R. Anholt, J. Lindstrom and M. Montal: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (1980) 3057.
 - ③2 J. M. Gonzalez-Ros, A. Paraschos and M. Martinez-Carrion: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (1980) 1796.
 - ③3 E. Neher and B. Sackmann: Nature (London). (1976) 799.
 - ③4 F. Conti and E. Neher: Nature (London). 285 (1980) 140.
 - ③5 M. Eisenberg, J. E. Hall and C. A. Mead: J. Membrane Biol. 14 (1973) 143.
 - ③6 B. Hille: Membrane - A Series of Advance, vol. 3, Dynamic properties of lipid bilayers and biological membrane. (ed. G. Eisenmann) (1975) Marcel Dekker, Inc. New York, p255.
 - ③7 T. M. Dwyer, D. J. Adams and B. Hille: J. Gen. Physiol. 75 (1980) 469.
 - ③8 F. Kukita and S. Yamagishi: Proc. Jpn. Acad. 56 ser.B (1980) 51.
 - ③9 F. Kukita and S. Yamagishi: (1981) (in preparation)
 - ④0 G. Baumann and G. S. Easton. J. Membrane Biol. 52 (1980) 237.
 - ④1 F. Kukita and S. Yamagishi: J. Membrane Biol. 47 (1979) 303.
 - ④2 C. M. Armstrong and F. Bezanilla: J. Gen. Physiol. 63 (1974) 533.
 - ④3 F. J. Sigworth and E. Neher: Nature (London) 287 (1980) 447.