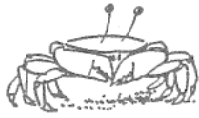


生体膜興奮とイオンチャンネル



研究ノート

葛西道生*

1. はじめに

細胞の刺激受容や、細胞間の情報伝達には電気信号が重要な役割を演じている。電気信号は細胞の電氣的興奮によって発生し伝達される。その電気信号の発生メカニズムを分子レベルで理解しようとする研究が近年盛んになってきた。

細胞内は外部に対して、通常数10mV電位が負になっている。この膜電位差の形成には種々の要因があるが、その中で重要なのは拡散電位である。細胞内外にイオンの濃度差があり、イオンの選択透過性があると拡散電位が発生する。イオンの濃度差は細胞膜に存在するイオンポンプによって維持され、通常の細胞では内側は K^+ が多く、外側は Na^+ が多い。イオンの選択透過性は細胞膜に存在するイオンチャンネルによって制御されている。イオンチャンネルはそこを流れるイオンの選択性に従って、 K^+ イオンを通すものを K チャンネル、 Na^+ イオンを通すものを Na チャンネルという。

神経を例にとると、興奮していないとき（静止状態）は、 K チャンネルがわずかに開いているために、 K^+ の拡散電位によって細胞内は負になっている。これを静止電位という。興奮すると、 Na チャンネルが開き細胞内は正の電位になる。これが神経興奮のイオン機構であり¹⁾、このような現象が神経細胞膜で起こるのを活動電位（またはインパルス）と呼ぶ。インパルスの伝播によって信号が伝えられる。また、このようなイオンチャンネルは細胞膜の他に、細胞内小器官（オルガネラ）の膜にも存在する。

*葛西道生 (Michiki KASAI), 大阪大学基礎工学部, 生物工学科, 教授, 理学博士, 生物物理学

2. イオンチャンネルとは

従って、神経の興奮のメカニズムを分子レベルで考えることは、イオンチャンネルの開閉機構を研究することであると置き換えてもよい。イオンチャンネルは種々の実験から、イオンを通す孔であると考えられるが、機能的に考えると、図1に示すような4つの要素からなっている²⁾。即ち、センサー、ゲート、フィルター、通孔である。センサーは膜電位差や化学物質の存在を検出するもので、その情報がゲートに伝え

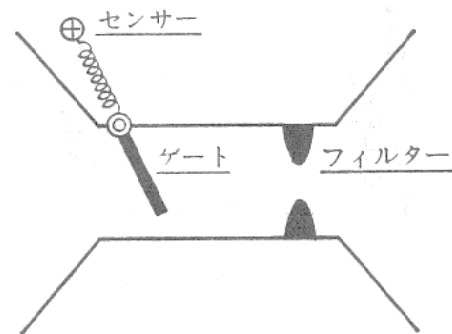


図1 イオンチャンネルの概念図

られゲートの開閉を制御する。フィルターはチャンネルの最も狭いところで、イオンの選択性を決める。通孔はフィルターと共にイオンの通り易さ、即ちコンダクタンスを決める。近年の実験技術の進歩によって、チャンネルがモデルとしてではなく、実体として研究できるようになってきた。その1つに1個のチャンネルを流れる電流の測定がある。その方法の1つは、神経などの細胞膜に少し太めの電極を強く接触させ、電極の内側に存在するチャンネルの活動を調べるもので、パッチクランプ法と呼ばれる。他は、イオンチャンネル分子を人工膜に埋め込みそこを流れる電流を測る方法である。ここではイオンチャンネルの一例として我々が中心になって行っている筋小細胞体膜のものについて

述べる。

3. 筋小胞体のイオンチャンネル

筋小胞体は筋細胞内において、神経の興奮に反応して細胞内にCaイオンを遊離し筋を収縮に導き、Caを取り込むことによって筋を弛緩に導くはたらきをするオルガネラである。この筋小胞体のCa取り込みや、遊離のメカニズムの研究には、細胞からばらばらにして取り出した筋小胞体ベシクルがしばしば用いられる。筋小胞体ベシクルは比較的大きさのそろった直径約0.1 μ m、厚さ10nmの球殻状の膜でできた袋で、Caの取り込みや遊離の能力を保持している。ベシクルにはCa取り込みを行うCaポンプと呼ばれる蛋白質が多数存在するが、その他に各種のイオンチャンネルが存在することが最近分かってきた。

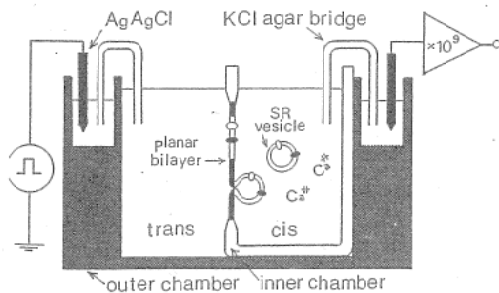


図2 単一チャンネル電流測定法の模式図。
シス側に膜ベシクルを加えると脂質平面膜に融合しコンダクタンス変化が測られる。

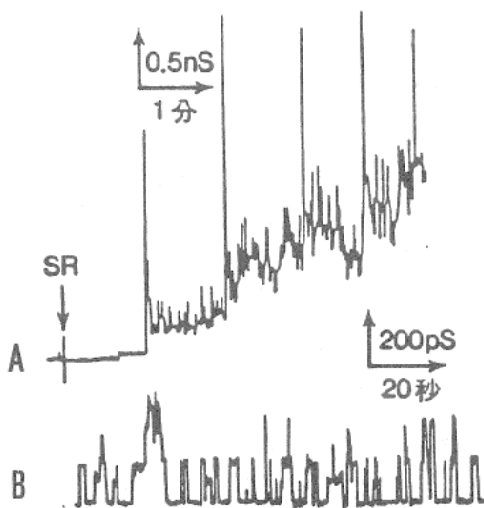


図3 コンダクタンス変化の記録。0.1MK⁺中で測定。
Aはマクロな測定、1つのスパイクが1個のベシクルの融合に対応。Bはマイクロな測定、単一チャンネルコンダクタンスが分かる。

図2のような装置を作って、筋小胞体ベシクルを人工膜に融合させると、図3Aに示すようなK⁺イオンによる電流が観測される³⁾。初めにスパイク状の大きな電流がみられ、徐々に電流が小さくなっていく。電流が小さくなった後には電流のゆらぎが見られる。電流のゆらぎを拡大してみると、図3Bのように電流は一定の単位から成っていることが分かる。これが単一チャンネル電流である。すなわち筋小胞体には0.1MK⁺中で180pSを示すカチオンチャンネルが存在する。電流のゆらぎはこのチャンネルの開閉のゆらぎによっていることが示された。

また、膜ベシクルの融合直後のスパイク状の電流を詳しく観測すると、単一チャンネル電流の単位から成っていることが分かった。従って、このスパイクは融合の瞬間に開いていたチャンネルが閉じていく過程であると結論できた。いま膜小胞が融合の瞬間に全て開いていると仮定すると、ピーク電流から1個の膜ベシクルは約10個のカチオンチャンネルを持つと推定できる⁶⁾。この推定値は平均電流とチャンネルの開確率の電位依存性から求めたものと一致する。

Millerらの詳しい実験によると^{4,5)}、カチオンチャンネルには1個の電荷を持つセンサーがあり、膜ベシクルの内側が負の電位になると開くゲートをもつ。フィルターは1価カチオンしか通さず、選択性はK>Rb>Na>Liの順であり、比較的コンダクタンスの大きいチャンネルであることが結論される。

同様の実験をCl⁻中で行うと、アニオンチャンネルが存在することがわかる³⁾。このチャンネルのベシクル当りの数は1-2個と少ない。殆ど電位依存性を示さず、0.1MCl⁻中で約200pSの単一チャンネルコンダクタンスを示す比較的イオン選択性の少ないものである。

5. チャンネルを流れるイオンフラックス

単一チャンネル電流の測定は1個のチャンネルの性質を浮き彫りにするが、全てのベシクルが同じ確率で融合するとは限らない。従ってベシクルが平均としてどれだけの透過性を示すかは分からない。ところがこのようなチャンネルが存在するとイオンの透過速度は非常に大きく、

通常のトレーサー法では測定できない。例えばベシクルに100 pSのチャンネルが1個あるとすれば、その透過時間は約2 msecになる³⁾。そこで、我々は蛍光消光法を用いた。ベシクル内に蛍光色素、ピレンテトラスルホン酸 (PTS) を取り込ませ、ストップフロー法によって Ti^+ と I^- のベシクル内への流入による蛍光の消光速度を測った(図4)。 Ti^+ と I^- は K^+ と Cl^- の代わりに用いたもので、電気的測定によると Ti^+ は80 pS、 I^- は200 pSのコンダクタンスであった。これらのデータを解析した結果、図5に示すような時定数を持つ多くの成分が得られた。一番速い成分は、 Ti^+ については約2 msec、 I^- につ

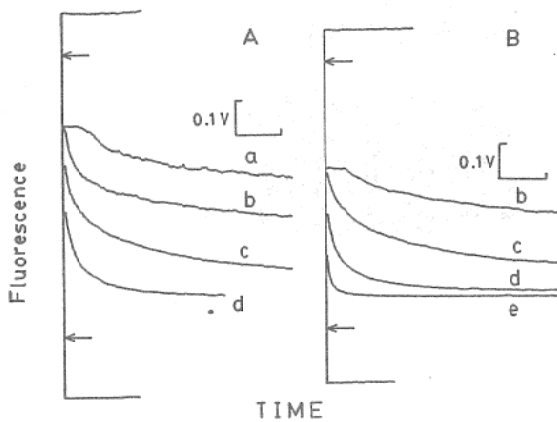


図4 Ti^+ の流入による蛍光消光。Aはシングル、Bはダブル混合。時間は：a) 2, b) 20, c) 200msec, d) 2, e) 20sec.

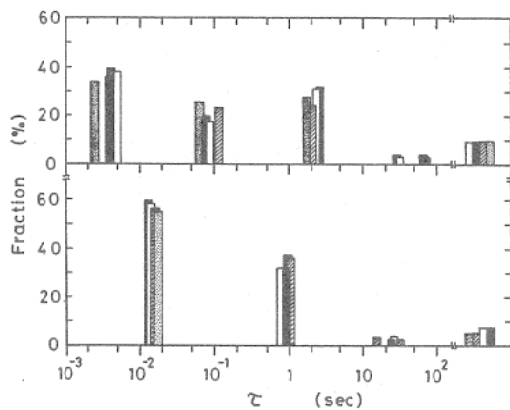


図5 イオン透過時間の分布。図4のようなデータを解析したもの。A) Ti^+ 、B) I^- 。

いては10msecで、電気的測定から期待されたものと同じオーダーでありチャンネルを流れるイオンフラックスが直接測定されたことになる。すなわち、電気的に観測されたチャンネルはベシクルに平均的に存在するものであることが証明された。また同様の方法で H^+ の透過性も求められている⁷⁾。

6. おわりに

ここでは、筋小胞体膜に存在するカチオンチャンネルを中心に述べたが、我々は、この他にも筋小胞体膜のCaチャンネル、筋T管膜のイオンチャンネル、シビレエイ電気器官の Cl^- チャンネル⁶⁾、酵母液胞膜のKチャンネル等を同様な方法で研究している。研究の流れはこれらのチャンネル分子を単離しその分子構造の上に立って、開閉のメカニズムを分子レベルで解明する方向に進んでいる。しかし、一般にはイオンチャンネルは1個あれば細胞膜電位を変化させることが出来るためその量は少なく、極端な場合は細胞当たり数個しか存在しない。そこで遺伝子工学的方法が威力を発揮しつつある。

文 献

- 1) 松本 元：神経興奮の現象と実体 (上下), 丸善 (1982)。
- 2) 葛西道生：蛋白質核酸酵素 別冊28 (1985) 102。
- 3) M.Kasai, K.Nunogaki, K.Nagasaki, M.Tanifuji, M.Sokabe: Structure and Function of Sarcoplasmic reticulum, eds. S.Fleischer, Y.Tonomura, Acad. Press, New York (1985) p. 537。
- 4) P.Labarca, R.Coronado, C.Miller: J.Gen. Physiol. 76 (1980) 397。
- 5) R.Coronado, R. T.Rosenberg, C.Miller: J. Gen. Physiol. 76 (1980) 425。
- 6) T.Kanemasa, K.Banba, M.Kasai: J.Biochem. 101 (1987) 1025。
- 7) K.Nunogaki, M.Kasai: Biochem. Biophys. Res. Commun. 140 (1986) 934。