生体膜の興奮の側面

— その1. 過分極反応 —

大 川 和 秋*
岸 本 卯 一 郎*

すでに本誌「生物物理」Vol. 6¹⁾に、植物細胞(*Nitella*, *Chara*) の興奮についての話が掲載されている。その内容も本原稿と合わせて読んで頂きたい。

I. はじめに

Chara および *Nitella* の話を中心に進めるが、図1に実際に測定する節間細胞の模式図を示す¹⁾。また本文に登場する人工池水の組成を表1、*Chara*^{1,2,3)} および *Nitella* のイオン分布を表2に示しておく。

図1 *Chara*, *Nitella* の節間細胞の縦断面¹⁾

表1 人工池水(A.P.W.)の組成

KCl	0.05 mM
NaH ₂ PO ₄	0.05 mM
NaCl	0.2 mM
Ca(NO ₃) ₂	0.5 mM
MgSO ₄	0.1 mM

A Side View of Excitation of Biological Membranes:— 1. Hyperpolarizing Response

* Taka-aki OHKAWA and Uichiro KISHIMOTO;
大阪大学教養部生物学教室
(Department of Biology, College of General
Education, Osaka University)

*) KCl を KNO₃ で置き換えることもある。

表2 *Nitella*, *Chara* の細胞内のイオン組成

Material	Cell sap			Protoplasm			References
	K	Na	Cl	K	Na	Cl	
<i>Nitella flexilis</i>	69	49	173	79	2	27	(1973) ⁽³⁾
<i>Chara australis</i>	107	25	136	101	1	17	(1973) ⁽³⁾

I-1. 解析の前提

生体膜の電氣的等価回路は、膜抵抗(r_m)と膜容量(c_m)の並列回路で記述される場合が多い(図2(a))。しかし微小電極(μ -Tip)を細胞内に置き、外部の参照電極(Ref.)との間で膜現象を観察する限り、必ず膜以外の要素の影響も考慮しておかねばならない⁴⁾。すなわち *Chara* や *Nitella* では、膜以外の要素として、いわゆる非攪拌層を含めた外液、細胞壁(cell wall)、原形質、液泡といったものが含まれる。

図2 膜の等価回路

r_m : 膜抵抗, r_s : 膜に付加する直列抵抗
 $r (= r_s + r_m)$: 膜起電力に固有な直列抵抗
 c_m : 膜容量, V_m : 膜電位
 E_m : 膜起電力, v_m : 計算に必要な電圧

図3は電流固定法のもとで、図4は電圧固定法のもとで閾値以下の信号波形を送った時の膜の応答波形である(電流供給電極の一方は、細胞内に軸平行に挿入されている。測定部域の長さは6mmであり、外液は人工⁵⁾池水である)。それぞれの波形の解析の詳細は文献⁵⁾を参照されたい。図3(b)あるいは図4(b)の三角波に対する応答波形より、膜容量 c_m は比較的容易に決定できるが、興奮時のように膜抵抗 r_m が著しく減少する場合、電圧固定法による方が正確に測定できる⁶⁾。ここでは図3(a)の短形波電流を流した時の膜の応答波形について解説する。図3(a)において、電流 on と off の瞬間、応答波形に跳びがあり、のち指数函数的な電圧の過度現象を経て定常状態に達する。この跳びは膜に直列な膜以外の要素 r_s に起因する(この r_s を付加直列抵抗 additional series resistance⁷⁾と呼ぶことにする)。すなわち実際の測定結果には、膜の起電力(emf)を考慮して図2(b)の等価回路が適用で

(a)

(b)

図3 閾値下の電流に対する膜の応答

(a): 短形波電流(下) 膜の応答波形(上)
パルスの時間は約100ms.

(b): 三角波電流(上) 膜の応答波形(下)
パルスの時間は約120ms.

(a)

(b)

図4 閾値下の短かい電圧変化に対する膜の応答

(a): 短形波パルス(下), 電流の波形(上)

(b): 三角波パルス(上), 電流の波形(下)

(a), (b), いずれも約20msのパルス

きる。跳びの大きさから r_s がわかり、指数函数的な部分の $1/e$ の時間をもって膜時定数 ($\tau_m = r_m \cdot c_m$) を求め、定常状態より $r = r_s + r_m$ の値を決定できる。このようにして決定した膜系の定数より、応答波形を再合成してみると図5の○印で示した波形になり、実線の観測波形に較べて5%もずれることはない。また三角波に対する応答、電圧固定のもとでの応答波形の解析結果も、同程度の誤差範囲内に収まる。したがって第1近次として、図2(b)の等価回路を信頼してよい。しかしたとえば図3(a)の波形を厳密に解析してみると、実は少なくとも2つの時定数(その大きさには大きな差がない)が存在する。このことは、電圧固定法により Chara の膜の impedance locus を求めた時、2つの時定数を持つ等価回路が、impedance locus を見事に説明できることに対応すると考えられる⁸⁾。このような膜の two-time constant model は、筋線維や、イカの giant axon でも提案されている⁹⁾。

しかし、本原稿では、第1近次としての図2(b)の等価回路を採用する。

電流固定法もしくは電圧固定法において、矩形波あるいは三角波を信号波形として使った時、その定常状態の応答波形より、膜の emf の変化を含まない限りは $r = r_s + r_m$ が求まる。Hodgkin-Huxley-Katz は Na-説を発表した一連の論文において、イカの giant axon では $r_m = 1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 程度であり、 $r_s = 7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ として解析している¹³⁾。イカの場合、静止時における r_s の値は、 r_m に較べてほとんど無視してもよい。しかし筋線維の場合、たとえば Falk⁹⁾ あるいは Adrian¹²⁾ のデータでは、静止時においても r_s は r_m の10%程度占める。また私達の灌流したイカの giant axon の Bi-ionic な系¹³⁾でも、静止時において r_s は r_m の5~10%¹⁴⁾を占めており、無視できない大きさである。Cole⁴⁾が、Nitella の impedance locus を求めた時、興奮中にも r_s は変わらなかったし、また私達の実験でも、 r_s の変化はあるにしても実験の誤差以内であった。ともかく現在のところ膜の興奮時における r の減少は、 r_m の減少と見なしてよい。Chara⁶⁾では、膜の興奮時の r_m を、 $r_m = r - r_s$ として決定できる (r_s は静止時において決定した値を使用してよい)

図5 閾値下の矩形波電流に対する膜の応答波形
実線は測定された波形、○印は等価回路の
定数を右上のように選ぶことにより求めた
電位

定常状態での応答波形が $r = r_s + r_m (= 1/g)$ を表現することから、図2(b)の等価回路は、膜の起電力 (emf, E_m) と、それに直列な抵抗 r とに書き改めて議論できる。(図2(c))。私達はこの $r (= r_s + r_m)$ を、膜起電力に固有な直列抵抗 (inherent series resistance) と呼ぶことにする⁷⁾。図2(c)において、回路を流れる電流 I と、膜電位 V_m との間には、

$$I = g(V_m - E_m) \quad (1)$$

の関係式が成立するはずである。電圧固定法とは V_m を固定することであって、 E_m を固定しているものではないことに注意すべきである。静止レベルからのズレを問題にすれば、

$$V = V_m - V_r \quad (2)$$

$$E = E_m - E_r \quad (3)$$

として、ズレの大きさは V , E で表現される。 V_r , E_r は電流の流れていない状態での静止時における膜電位および膜の起電力であり、 $V_r = E_r$ である。 V および E によって、式(1)を書き直すと、

$$I = g(V - E) \quad (4)$$

となる。これからわかるように、 V_m と E_m (あるいは V と E) とは一般には一致しないと考えておくべきである。 $V_m = E_m$ (あるいは $V = E$) を直接測定できるのは、式(1)または式(4)で明らかなように、 $I = 0$ を保ちつつ膜現象を捉えた時のみである。また $V = 0$ (すなわち $V_m = V_r$) に膜電位を固定したまま、流れる電流 I を観測した時、(たとえば次に示す図6(b)のような実験)、 $I = -g \cdot E$, すなわち膜の emf の変化のみがイオン電流の原因となっている。

図6(a)は、電流固定下で、始めの60 msecに脱分極パルスを与え、その後 $I = 0$ に保った実験である。図中○印の時間に、図3(a)で示した如き、約100 msec 強さ $2.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ の矩形波電流を重畳させてあり、その応答波形をオシロスコープ上で写真に取った。図の始めと終りの跳びの大きさは、膜の興奮中も変わらない(すなわち r_s は変わらない)。 $g (= 1/r)$ (○印)の表現では興奮時の変化は静止時の約10倍であり、通常5~10倍程度である。一方上記の r_s を差し引き、 $g_m (= 1/r_m)$ (●印)の表現を取れば、この例では約30倍以上の変化をすることになり、約100倍程度の変化を得ることも多い。

図6(b)は電圧固定のもとで、始めに60 msecの脱分極パルスを与え、その後の膜電位を静止レベルに固定してある時の電流の波形である。この場合も○印の時間に約20 msec、大きさ約25 mVの矩形波パルスを重ねてある。この時も、 g と g_m の表現を比較すれば随分差がある。このようなことは、アイソトープを使つての flux の測定より計算した conductance と、電気的に測定した conductance の値の異なる¹⁶⁾原因を議論する際にも考慮しておかねばならないであろう。

以上膜に付加的な直列抵抗 r_s に注意して話を進めてきたが、さらに現在わかっている r_s の性質につ

(a)

(b)

図6 (a): 60 msec の脱分極パルスで誘発された活動電位。○印の時間に 2.0 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、約 100 ms の矩形波パルスが重畳されている。パルスに対する応答波形が図に示してある。これより g , g_m が求まる。

(b): 60 msec の脱分極パルスで誘発された内向きの電流。○印の時間に、2.5 mV、約 20 msec の矩形波パルスが重畳されており、その電流の波形が、図に示されている。 g , g_m はこの波形より求めたものである。

いて記述しておく¹⁷⁾。

① Ref. の位置により、 r_s は変化する。

r_s として Cole⁴⁾ は、その 80% が外液の抵抗によるとしている。事実、細胞内の μ -Tip と、細胞外の Ref. の位置関係を電力線に平行に置き、Ref. の細胞表面からの距離を変えると図 3(a) の始めと終りの跳びの大きさが変わる (図 7)。細胞壁より 200~300 μ 以上離れた所では、跳びの大きさは距離に対して直線的に変化する。その勾配は材料によってもほとんど変わらない。したがって溶液抵抗を示している。しかし 200~300 μ 以内に近づくと、あまり変化しない。このことは cell wall pot.¹⁸⁾ の結果と合わせてさらに考慮すべきである。 r_s の値は、人工池水中で $2\text{K}\Omega\cdot\text{cm}$ 前後が多いが、季節により多少の変動はみられる。

図7 細胞壁を基準に、Ref. の位置を変えた時の膜に直列な抵抗 r_s の値

② 溶液の濃度変化により、 r_s も変化する。

このことは r_s の内容より考えて当然のことであるが従来、膜抵抗の変化を測定するにあたって、 r_s と r_m を区別した詳しいデータが見当たらない。表 3 に Ref. の位置を細胞壁から 200 μ においた状態で、外液を 0.1 M KCl より、100 mM KCl まで変えた時の r_s , r_m , c_m および $\tau_m (= r_m \cdot c_m)$ の値を示しておく。電流固定法により、矩形波電流、三角波電流を流した時の膜の応答波形より決定したものである。イオン濃度の高いところで、 c_m の増加がみられるが、膜の興奮時における c_m の増加と比較できるかもしれない。

1-2. 実験面から見た電流固定法と電圧固定法

‘電流固定法および電圧固定法の技術面に関しては文献を参照されたい。また二つの方法の根本的な概念については、文献(4)を読まれることを期待する。ここでは従来あまり指摘されていない面を実験者の立場から触れておく。

① 信号波形に対する応答波形の時定数は、電流固定法では $\tau_m (= r_m \cdot c_m)$ であり、膜の時定数そのも

表3 外液を KCl 0.1 mM より 100 mM 迄変化させた時の膜の定数の値

Solu- tion	$r_s + r_m$ ($k\Omega \cdot cm^2$)	r_s ($k\Omega \cdot cm^2$)	r_m ($k\Omega \cdot cm^2$)	C_m ($\mu F/cm^2$)	τ_m (mS)
A. P. W. (人工池水)	16.46	1.27	15.02	1.33	20.13
0.1 mM KCl	20.28	3.50	16.70	0.84	13.96
0.4 mM KCl	12.64	2.27	10.37	1.23	12.70
1.0 mM KCl	12.27	1.41	10.75	1.57	14.71
4.0 mM KCl	3.58	0.90	2.68	1.62	4.33
10 mM KCl	1.80	0.61	1.19	2.07	2.39
40 mM KCl	1.12	0.37	0.75	2.71	2.03
100 mM KCl	0.71	0.35	0.36	4.67	1.69

のである。一方、電圧固定法では $\tau_m \times r_s / (r_s + r_m)$ となり、 τ_m に較べて $r_s / (r_s + r_m)$ 倍だけ小さくなる。このことから膜の応答波形を観測する際、電圧固定法の方が電流固定法に較べて短かいパルスでその定常状態を観測できる。たとえば通常の *Chara* の細胞では、 $r_s = 2 k\Omega \cdot cm^2$, $r_m = 15 k\Omega \cdot cm^2$, $c_m = 1 \mu F/cm^2$ 程度が多い。したがって電流固定法では、応答波形は 15 msec 程度の時定数を示す。一方、電圧固定法では 1.8 msec の時定数となる。イカの giant axon においては、もっと極端な違いが出る。

② 膜抵抗が観察の現象中減少する場合、電圧固定法を用いた方がよい。なぜならば電圧が固定されていることにより、膜の抵抗の減少分は電流の増加として測定される。逆に膜抵抗が増加する場合、電流固定法を用いた方がよい。電流が固定されていることにより、膜抵抗の増加分は電圧変化の増加として測定されるからである。

③ 実際の測定回路作製にあたり、周波数特性を比較すると、電流固定法の方が、電圧固定法よりも容易に周波数特性を改善できる。膜に付加的な直列抵抗 r_s を決定する時には、周波数特性の充分に良い測定系が要求される。

④ 膜容量の変化を測定するには、膜抵抗の変化の度合と、測定系の周波数特性とを考慮の上、どちらの方法がより正確であるかを決定しなければならない。

以上①～④の事柄を考へて、実験にあたっては電流固定法と電圧固定法とを併用するのが望ましい。

I. *Chara* の過分極反応の解析を中心に

ここでは、ある種の感覚細胞や、抑制性の synapse、また緑藻で観られる光刺激に対する反応などの過分極反応 (hyperpolarizing response, H.R.) には触れない。通常の all-or-none 則に従う活動電位 (a.p.) に対し、膜の裏向きの興奮の代表としての H.R. を解説する。

筋肉や、神経において、外液のリンガー液あるいは海水中の NaCl を KCl で置き換えていくと、膜は脱分極し、静止電位 (r.p.) が次第に浅くなる。ある程度以上脱分極した膜では、通常の外向きの電流では顕著な a.p. はみられない。しかし、一定以上の内向きの電流を流し続けると、膜電位は急激に過分極側へ移動する。この現象を過分極反応 (H.R.) という。

I-1. 歴史

H.R. の現象は、Blinks が海産の緑藻の一種である *Valoniopsis*²¹⁾, *Halicystis*²²⁾ で、また淡水産の緑藻 *Nitella*²³⁾ で観察したのが最初である。図8は、Blinks が *Nitella* の外液を 0.05 M KCl にした時に観察した H.R. である。神経等の動物細胞で観察されたのはずっと後の事であり、Lorené²⁴⁾ がカエルの神経で報告している。しかし実際に H.R. が注目されるようになったのは、さらに後の Hodgkin-Huxley のイカの giant axon²⁵⁾ での見事な現象論的解析以後のことである。原生動物の夜光虫^{26, 27, 28, 29)} で観察されたのは、この H.R. であった。カエルの Ranvier node^{30, 31, 32, 33)} や、イカの giant axon^{34, 35, 36)} でも観察され、Hodgkin-Huxley の Na⁺ 脱に従って H.R. を解釈する試みも行なわれた。その段階において、K-inactivation の概念^{33, 37, 38)} が導入されている。夜光虫以外の上記の実験結果を総合すると、外液に Ca⁺⁺, Na⁺, Cl⁻ は特別に必要ではないと予想される。しかし Reuben 等の観察した lobster の筋繊維の H.R. は、あらかじめ K⁺ で膜を脱分極させていない膜のものであり、H.R. 中の膜電位は、外液に Ca⁺⁺ を添加することにより、過分極レベルにより安定に留まると報告されている。

Kishimoto⁴⁰⁾ の *Nitella*, *Chara* でこの現象を観察した結果は、外液の K⁺ を、Li⁺, Na⁺, Rb⁺, Cs⁺ で代用しても観察可能であり、さらに ATP, EDTA, あるいは EGTA 等のキレート剤を作用させても、H.R. が起こった。その結果この H.R. に必要な条件は、

図 8 Blinksが得た *Nitella* での Hyperpolarizing Responses.²¹⁾

あらかじめ膜表面の Ca^{++} を除去することにあるとした。また最近では *Acetabularia* (カサノリ)⁴¹⁾ での観察結果もあり、中でも興味深いのは、*Nitella*, *Chara* の原形質ドロップ^{42, 43, 44, 45)}の結果および、*Halocynthia* (ホヤ) の卵の発生段階で観られる反応である。*Nitella*, *Chara* の原形質ドロップを入口 cell sap 中で作ると、ドロップの形成初期の r.p. はほとんど零付近にあったが、時には内側が正である場合もあった。このような状態のドロップに、一定以上の内向きの電流を流すと、顕著ではないが、H. R. がみられた (図 9(a))。その後、外液のイオン強度を減じることによって、典型的な H. R. や、通常の a. p. が観察されるようになった (図

図 9 (a): *Nitella* の原形質ドロップで観られた H. R. 内向き電流 (下) $-24 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ を 40 sec 流し続けた時の膜電位の変化。膜電位の最大の変化は -13 mV である。なお 3 Hz の交流が重畳してある。
(b): *Nitella* の原形質ドロップで観られた典型的な H. R.
(c): 同上の材料で得られた a. p.

(a)

9(b), 図9(c). その重要な結論として, イオン強度の問題以外に, 適度の Ca^{2+} , Mg^{2+} の存在がドロップの表面膜の機械的安定性, 電気的安定性に必要であること, および r.p. は, 内側が負に強くなるように時間的变化を示すことが指摘されている。^{43, 44)} r.p. の浅い状態で H.R. が観られ, 深い状態では通常の a.p. が観られたことになる。Halocynthia の卵の場合も, 発生の各段階で r.p. が異なり, 異なる反応 (H.R. あるいは a.p.) をすることが報告されている。^{46, 47)} このように H.R. と a.p. とが背中合わせに観察されるという結果は, Valonia でも同様であった。Valonia の細胞は, 通常の海水中での r.p. は液胞側が正であり, この時 H.R. を示す。海水中の Cl^- を減じると, r.p. は -40 mV 程度になり, このような状態で通常の a.p. に近い応答が得られた (ただしこの時は, 膜抵抗は増加する方向であった)。⁴⁸⁾ 同様のことは汽水中に住む Lamprothamnium についても期待できるし, ウニ卵の受精膜⁴⁹⁾ の電位変化を眺めると, やはり期待できそうである。^{50, 51, 52)}

以上のような H.R. に関する研究の歴史を背景にすると私達は次のことを銘記しておいてよいだろう。

① いわゆる興奮膜が a.p. を起こすか, H.R. を起こすかは条件次第である。

② 生理条件下では通常の a.p. を示さなくても, H.R. を示す細胞は多々あるのではないか。

③ 原形質ドロップ膜や, Halocynthia の卵での観察結果は H.R. や a.p. が膜の形成過程と密接に関係していると思われる。

I-2. 過分極反応 (Hyperpolarizing Response, H.R.)

Chara および Nitella の細胞内イオン分布は先に表2に示した。この細胞の r.p. は, 神経などと同じように内外の K^+ の平衡電位に近いといわれている。しかし一方で, H^+ の関与を重要視する報告もある。実験に使用する人工池水中の K^+ イオンの濃度は 0.05 mM , pH は $5.6 \sim 5.8$ 程度である。r.p. は $-130 \sim -170\text{ mV}$ のものが多い。

人工池水を KCl で置き換える時, $(\text{KCl})_0 < 1\text{ mM}$ では r.p. はあまり変化しないが, $1\text{ mM} < (\text{KCl})_0 < 5\text{ mM}$ で膜は少し脱分極を始め, $5 \sim 10\text{ mM} < (\text{KCl})_0$ で10倍の濃度変化に対して, ほぼ $50 \sim 55\text{ mV}$ で変化するものが多い (なお内側を灌流しての実験結果は文献 (54), (55), (1) を参照されたい)。 50 mM KCl 中では $-40 \sim -50\text{ mV}$, 100 mM KCl 中では $-10 \sim -20\text{ mV}$ 程度の r.p. のものが多い。このような脱分極した膜に, 一定以上

の内向きの電流を流し続けることにより H.R. が観察されるが, 図10(a)に 50 mM KCl 中での Chara の H.R. の数例を示す。同図には, H.R. 中の r と E の変化の様子も示した。r と E は, 図6(a)に示したように, 適度の頻度で, 短かくて小さい矩形波または三角波パルス電流を一定電流に重畳し, そのパルスに対する応答波形の定常状態より瞬時の r を求め, 式(4)に従って瞬時の E を決定できる。膜電位 V は一定電流の大きさによらずに, 約 55 mV 過分極側へ移行した時, 急激にさらに過分極側へ移行して定常レベルに落ち着く。電流の大きさがある程度以上大きくなると, 膜電位に一種の undershoot が現われ, 過分極側への移行過程も早くなる。このような現象はかなり一般的であるが, 外液が 100 mM KCl 程度になると顕著な undershoot が観られなくなることもある。実験結果として, 電流-電圧 ($I-V$) 曲線をまとめるためには, 通常の人工池水中での実験と同じように, 充分の回復時間を待たねばならない。図10(a)の Chara での一連の実験より, H.R. 中の $I-V$ 曲線を求めると図10(b)のようになる。すなわち, 電流を流し始めて直後の電位 (○), H.R. 中, 最も過分極側に移行した時の膜電位 (△), および, 過分極側での安定した電位 (●) をプロットしてある。それぞれが異なる傾斜の直線を形成する。すなわち図10(b)では, 最初のオームの法則に従う直線, -50 mV から -160 mV の範囲での slope conductance の低い直線 (静止レベルの -50 mV 近くを通る), -160 mV 以上での slope conductance の高い2つの異なる直線とである。 -50 mV から -160 mV の範囲での直線が静止レベル近くを通るために, H.R. の内容は誤解されやすい。すなわち, H.R. は最初のオームの法則に従う低い膜抵抗の状態からの高い膜抵抗の状態への移行で説明され, 膜の emf はほとんど変化していないように誤解される。実際には図10(a)に示すように膜抵抗の増加と膜の emf の動きの両方の結果の現象である。また, $I-V$ 曲線を slope でみる時には, 理由はわからないが, -160 mV 以上の過分極側での2本の直線は, V_m -軸上でほぼ一致することが多い。

H.R. 中, 膜抵抗 r_m が最大になるのは, 膜電位が最も急激に過分極側へ移行する附近であり, その後少し減少する。同様なことは, Tasaki のイカの giant axon の時の bridge unbalance の時間経過に示されている。³⁶⁾ (なお第I章で r_s の変化が観測されないことを述べた。したがって $r (= r_s + r_m)$ は, r_m が最大となる時に最大となる。図10の Chara

図 10 (a) : *Chara* の過分極反応および r (●), E (○) の変化

(b), (a) より求めた膜の $I-V_m$ 曲線

○印: 電流の on 直後のオームの法則に従う電位

△印: 過分極反応中に観られる最大の過分極レベルの電位

●印: 定常状態のレベル

の細胞は, 50 mM KCl 中で r_s は $200 \Omega \text{ cm}^2$ であった。) 膜の emf は, 膜電位の急激な過分極側への動きとほぼ平行して過分極側へ動く。

また emf は始めに少し脱分極側へ動くことがある⁵⁶⁾がこの傾向は, 外液の K^+ 濃度が低い時には顕著に現われる。過分極側に膜電位が移行しているにもかかわらず emf が脱分極側に動くことは一見奇妙に思えるが, 現象的には次回に述べる anode-break excitation や, いわゆる breakdown の現象の場合にも起こっている。また極端な場合として, 通常的人工池水中の細胞で, 内向きの電流を流し続けているにもかかわらず, a.p. が観察されることすら時にはある。

次にイカの giant axon での H.R. について, 私達の得ている結果を示す。外液の K^+ 濃度を変えての実験はすでに文献 (34), (35), (36) に記載されているので, ここでは内部灌流を行なったイカの giant axon での H.R. について述べる⁵⁷⁾。Axon 内部をあらかじめ pronase で灌流⁵⁸⁾しておき, その後 50 mM KF を内液として使用した。図 11(a) は外液 60 mM KCl + 4.0 mM CaCl_2 の条件下で得られた H.R. であるが, 内向きの電流によって, 膜電位が -18 mV 程過分極側に移行すると, 急激な電位変化がみられる。しかし同程度の外向きの電流では, 顕著な反応はみられない。*Chara* の細胞において,

図 10(b) に $I-V$ 曲線を求めたように, イカの giant axon の場合の $I-V$ 曲線を求めると, 図 11(b) のようになる。すなわち, 始めのオームの法則に従う電位, 電流 on の後 0.5 秒経た時の電位, および膜電位の過分極側へ移行後の定常レベルの電位がプロットしてある。この場合も, 図 10(b) と同じように, 定常状態の $I-V$ 曲線は静止レベル近くを通る直線となる。外液の Ca^{++} 濃度を少なくした時 ($\text{Ca}^{++}_o = 1.5 \text{ mM}$), H.R. 中の膜電位は不安定になり, 元の静止レベルに戻ろうとすることがある (図 12(a))。図 12(a) では約 200 サイクルの交流

図 11 (a): 灌流したイカの giant axon で観られた過分極反応, 外液 6.0mM KCl+4.0 mM CaCl₂//50mM KF 内液
(b): a 図より求めた I-V 曲線

が重畳してあり、この振幅の変化より、 r の変化および E の動きを求めると図 12(b) のようであった。膜電位の過分極側への移行と共に、はじめ膜抵抗も増加するが、膜電位が不安定に不連続的に静止レベルの方へ戻ろうとする時、膜抵抗は著しく減少する。しかしこの時の emf の変化は比較的少ない。

次に Chara の脱分極した膜の性質を、電圧固定法により、さらに詳しく調べた結果を述べる。脱分極した膜に限らず、一般に膜の $I-V$ 曲線の大半の性格を知るには、適度の傾斜を持った時間的に直線的に増加する三角波で膜電位を走査するとよい。すなわち膜電位を $V = kt$ (k は定数、そのディメンションは $[mV] / [sec]$ である。 k の大きい時の実験結果は、文献(6)をみられたい)で走査し、瞬時に於ける $g (= 1/r)$ を短かいパルスを重畳することによって求める。したがってこの時、瞬時の $I = g(V - E)$ の直線が求まる。図 B (a) は 100mM KCl 中で、 $k = 3.7 mV/sec$ のゆっくりした速度で膜電位を走査し、最終レベルは $V = -230 mV$ に達するようにした時の電流 I のパターンと、conductance g および膜の $emf E$ の変化を示したものである。同図(b)は、(a)を $I-V$ 曲線に書き改めたもので、矢印の直線の傾斜は瞬時の g を、直線と V_m - 軸との交点は、瞬時の emf を示している。

図 12 (a) 外液の CaCl₂ 濃度を薄くした時に得られた不安定な過分極反応, 外液 6.0mM KCl+1.5 mM CaCl₂//5.0mM KF 内液. 2枚の写真はいずれも上部が電流, 下部が電圧. 200 cycle の交流が重畳されている。電圧の振幅の変化に注意, オッシロスコプの sweep は 0.5 sec/cm.

図 12 (b) : 同図 (a) のような不安定な H.R. 中の r および E の動き。

図の $I-V_m$ 曲線では、 -130 mV から -163 mV の過分極の範囲が負抵抗域になっている。このような脱分極した膜でも、N 字型の $I-V$ 曲線が出現することの重要性は、すでにイカの giant axon で指摘されている³⁵⁾。通常的人工池水中の細胞では負抵抗の過分極側で安定した r.p. を保ち、脱分極した膜では負抵抗域の脱分極側において安定である。脱分極した膜での負抵抗域の存在は、当然膜電位のこの領域での過分極側への転移という期待に繋がる。このことは次に説明するが、図 13 でさらに注目していただきたいことは、膜の emf の過分極側への動きに最大値が、 g の減少に最小値が存在することで、電圧に依存して膜の emf

が無制限に過分極側へ成長するものではない。

膜電位を通常の電圧固定法のように、ステップ状の波形で種々のレベルに固定した時、各ステップに対応して流れる電流の時間経過より、時間をパラメータにした $I-V$ 曲線を求めることができる。図 14 は、⁵⁹⁾ 100 mM KCl 中にある *Chara* で得られた、時間をパラメータにした $I-V_m$ 曲線である。負抵抗が時間と共に次第に上部に移行し、遂には負抵抗域の存在が消滅するかのように見える。しかしステップ電圧変化の後、60 秒程経過した後でも、負抵抗域が残存する材料もある。人工池水中で得られる $I-V$ 曲線と比較すると、異なる点は次の通りである。

図 13 (a) : 膜電位をゆっくりした三角波で走査した時の電流 I , コンダクタンス g , 膜の起電力 E , の変化。

図 13 (b) : (a)図を $I-V_m$ 曲線に表現, ● 段における矢印で示した直線は瞬時の $I=g(V_m-E_m)$ を示す。

図 14 時間をパラメータにした $I-V_m$ 曲線

① 脱分極した膜では、負抵抗域において、電流が符号を変える程にまで減少することはない。このことは通常的人工池水中の場合、膜の emf が固定された膜電位を越す程にまで成長できるのに対し、脱分極した膜では、固定された膜電位にまで膜の emf は成長できないことと対応している。

② 脱分極した膜では、負抵抗域の過分極側で slope conductance が急激に増加しているが、同様に人工池水中の細胞で、 -200mV 程過分極側のレベルにおいて、slope conductance が急激に増加することがみられる。これは breakdown あるいは punch-through と呼ばれており、N字型特性とは別の現象で、その解析は次回に譲る。

人工池水中で、各レベルでの電圧固定中に流れる net の電流が零を示す時間と、その時の膜電位をプロットすることにより、通常の a.p. がほぼ再構成できた⁵⁹⁾。同様に脱分極した膜でも、上記の時間をパラメータにした $I-V$ 曲線より、H.R. の再構成が可能である。すなわち一定内向きの電流 $I = I_0$ が与られた時、膜電位は時間をパラメータにした $I-V$ 曲線上を、 $I = I_0$ の直線に添って時間的に移動する。負抵

抗域に達すると膜電位は過分極側へジャンプする。これが H.R. であり、再構成した H.R. は元の H.R. をある程度再現している。図 15(a) に図 14 において $I_0 = -3.5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ の一定電流に対して得られた再構成の H.R. (—○—) および、同じ大きさで得られた実測の H.R. (—) を比較して示す。また同図(b)も別の材料での比較である。実験方法の違いや、材料の性質の時間的変化などを考えれば、比較的一致してい

るといえる。また内向きの電流を流し続けておくことにより、膜電位を過分極側のレベルに安定に留めておくことができるが、この時に一定以上の脱分極パルスを与えると、通常の a.p. と同等のレスポンスを得ることがある(図 16)。この現象も、膜の I-V 曲線における負抵抗域のジャンプとして説明されることは明らかであろう。

図 15 再構成した H.R. (a). 図 14 において、 $I_0 = -35.0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ より再構成した H.R. (○印). 実線は同電流に対して観測された H.R. (b). 別の材料での再構成した H.R. (○印) と、実測の H.R..

図 16 一定内向きの電流に依り、膜電位を過分極レベルに留めておき、外向きの脱分極パルスを与えた時の膜のレスポンス。脱分極パルスの大きさと、時間が適度になれば、通常の a.p. と同等のレスポンスが観測される。

次にステップ状の電圧変化を膜に与えた時、膜の emf がどのように変化するかを図17に示す。一連の実験は、*Chara* の細胞の外液として、 Cl^- の代りに、 H_2PO_4^- を使用し、 5.0mM K^+ の濃度で行なわれた。 Cl^- の代りに H_2PO_4^- を使用しても、H.R. 自身には特別の違いを見出すことはできない。また電圧固定で得られる時間をパラメータにした I-V 曲線も、本質的な違いは生じない。さて膜の emf あるいは r は、電流固定法で解析した H.R. に較べても、あまり急速

な成長は見せず、どのレベルへの電位変化に対しても、その変化に応じて膜の emf は漸次成長する。しかし図13で指摘したように、膜電位をある程度以上過分極レベルに固定すると、膜の emf の過分極側への成長は却って抑えられるようになる。またある過分極レベルでは、emf は始めに脱分極側へ向かうことがある（図17右下）。このことは電流固定下の H.R. 中の emf の解析でも明らかにされたし、また図13(a)にも示されており、膜の emf の性質として注目しておいてよからう。

図17 ステップ電圧変化を与えた時の電流 I 、コンダクタンス g 、膜の起電力 E の変化。

以上述べてきたような脱分極した膜の emf の動きに基いて、問題点を明らかにしてみよう。Stämpfli³²⁾はカエルの Ranvier node で H.R. を観察した時、 K^+ の平衡電位から、 Cl^- の平衡電位への転移として説明した。しかし、 Cl^- のない状態でも H.R. は観察された。また膜の emf の変化というよりも単なる膜抵抗の低い状態から高い状態への膜状態の転移としての解釈もある。しかし、この解釈の主たる根拠は、図 10(b)あるいは図 11(b)に示した I-V 曲線において、オームの法則に従う直線と、H.R. の定常状態での I-V 曲線において、静止レベル近くを通る slope の抵抗の高い直線部分とを比較することによって結論されている。これまでに述べてきた解析の結果明らかに、膜抵抗の増加と、膜の emf の動きが実際には絡み合っている。

また一方、Hodgkin-Huxley の Na⁺ 説²⁵⁾では、通常のイカの giant axon に対して、Na⁺ の conductance に関して activation process と inactivation process の2つの要素が考慮された。同様の立場から、カエルの Ranvier node、イカの giant axon、lobster の筋繊維の H.R. を説明するのに、 K^+ に対しても inactivation process の概念が導入^{32,33,37,38,39)}されている。この K-inactivation の過程は 10~15 秒のゆっくりした時間で起こるとされている^{33,38)}。また先に述べたように、Moore³⁵⁾は、0.5 M の KCl 中でのイカの giant axon が、N 字型の I-V 曲線を持つことを指摘し、K-inactivation というよりも、N 字型領域の電位のジャンプを強調して H.R. を説明している。

植物細胞における H.R. に対する説明は、Acetabularia⁴¹⁾では Cl^- の透過性が高まることによるとされ、Valonia^{48,49)}での浅井の解析は、静止状態ではむしろ Cl^- の透過性が高く、H.R. 中に K^+ の透過性が高くなると結論している。また Chara や Nitella の原形質ドロップにおいても、その r.p. や、H.R. に対して K^+ と Cl^- の conductance によって解析が試み⁴⁵⁾られている。

Chara の場合、H.R. 中の emf の動きは過分極側への動きが主であった。この細胞の模式図を図 1 で見ると、これまで膜と述べてきた膜には、実は原形質膜 (plasmalemma) と液胞膜 (tonoplast) とが含まれていることがわかる。H.R. 中の emf の過分極側への動きは、表 2 の Chara のイオン分析値を参考にすれば、原形質膜での Cl^- の conductance の増加に依ると予想される。しかし emf の脱分極側への動きが

観察される場合があること、またある程度以上の膜電位の過分極レベルでは、emf の過分極側への動きが却って抑えられることなどから、液胞膜での Cl^- を中心としたイオンの透過性も考慮しておかねばならないであろう。しかし現在のところ、脱分極した膜においてイオンの flux を直接に測定したデータを持ち合わせていない。

ここで注意しておかねばならないのは、Chara の場合 Cl^- を $H_2PO_4^-$ に置き換えても H.R. は観察可能であった(さらに付け加えておくと、 Cl^- は F^- 、 NO_3^- でも代用がきく)。また K^+ の代りに Li^+ 、 Na^+ 、 Rb^+ 、 Cs^+ 等も膜を脱分極させ、H.R. が観⁴⁰⁾られた。ATP、EDTA、EGTA 等のキレート剤使用での実験結果と比較すると、結局上記の一価陽イオンの膜に対する作用効果は、膜表面の Ca^{++} の除去ということになるであろう。しかし後述するように、膜表面の Ca^{++} を極度に除去する実験を試みると、膜の N 字型 I-V 曲線は得られず、H.R. は観察できない。したがって膜表面の Ca^{++} の量と、N 字型の I-V 曲線を持つ膜の状態とは密接な関連があると思われる。

外液中の Ca^{++} の重要性について、Frankenhaeuser と Hodgkin⁶²⁾ は次のような結論を得ている。外液の Ca^{++} を e 倍変える効果は、Hodgkin-Huxley モデルの各パラメータをすべて電位軸上で 5 mV ずらすことにあった。また Mueller^{30,31,37)} は少し異なった立場から Ca^{++} の役割に注目している。通常の a.p. や、また H.R. のような興奮現象は、負に帯電した膜表面の固定電荷部域で、 $Ca^{++}-Na^+-K^+$ の化学平衡の状態と、2つの electromotance という feedback 系が関連することに依る膜電位の転移として考えられている。彼の electromotance の概念は抽象的なものであるが、Tasaki^{36,63)} 等は膜の物理化学的性質をさらに簡潔に、“two-stable-state”という言葉で表現している。膜の2つの安定な状態に、外液の Ca^{++} の役割が重要であるとする考えは、イカの giant axon の内部灌流の技術の開発と共に、極めて鮮明にされてきているといえよう。⁶⁴⁾

しかし一方、H.R. における Ca^{++} の役割を定量的に決定することは容易ではない。Nitella の原形質ドロップでは、外液に 2 mM 程度の Ca^{++} の存在が必須条件で、ドロップ形成後、時間の経過と共に膜電位は深いレベルに落ち着き、興奮性が発現するが、その初期の電位の浅い状態で、H.R. が観察^{49,50)}されている。Lobster の筋繊維の H.R. では、 Ca^{++} の外液への添加が、H.R. 中の膜電位を過分極側で安定に留めたが、 Ca^{++}

無しでは、不安定なことが度々観察された。同様のことは、私達の灌流したイカの giant axon でも観られ、外液の Ca^{++} を少なくすると、H.R. 中の膜電位は不安定になり、H.R. 中に増加した膜抵抗が減少することがわかった。

現在 Ca^{++} -free の溶液を普通に作ったのでは、 μM 程度の Ca^{++} の存在は考えておかねばならない。また、膜近辺の Ca^{++} が、全く除去されてしまう保証もない。Chara において、高濃度の EGTA を使用すると、不可逆的に膜抵抗は減少し、測定困難な事態を招く。このことは、膜表面の Ca^{++} が、膜の構造の安定性保持にも関連しているからであろう。いずれにしても、膜表面の Ca^{++} の脱着は、H.R. に不可欠のようにみえるが、その定量的決定は今後の課題である。

以上 Chara の細胞で観られる H.R. を中心に、H.R. を少し詳しく解説してきた。この解析の前提は、I-V で議論した膜の等価回路、図 2(c) にあった。その結果、H.R. のような膜の興奮現象も、膜の時間依存性の N 字型 I-V 曲線に依って説明されることが明らかにされた。また、H.R. 中の膜の emf の動きについても詳しく述べた。次回に anode-break excitation、また最近、膜の半導体類似の性質として注目されている break-down の現象を解説する。

この原稿の終りにあたり、Valonia の膜の諸性質について私達の研究室の浅井一視氏より、また Nitella, Chara の原形質ドロップの性質については大阪医科大学の岩崎尚彦氏より適宜議論を重ねて頂いたことを報告させて頂きます。北海道大学薬学部井上勲氏には、イカの giant axon での実験において、多大のお世話になったことも合わせて紙面上で感謝させて頂きます。

* 15~20 mM EGTA の使用では、10分間以内で脱分極した膜の H.R. が観られ、人工池水に戻すことに依り、通常の a.p. を再現できる。しかし 15~20 分以上の作用では、H.R. も観察されず、膜抵抗は不可逆的に減少する。

文 献

1. 岸本卯一郎:「生物物理」6, 25 (1966).
2. Kishimoto, U., M. Tazawa: *Plant and Cell Physiol.*, 6, 507 (1965).
3. 田沢仁, 岸本卯一郎:「植物生理学会誌」p.p. 182. 於 東京(1973年4月)
4. Cole, K. S.; 「膜, イオン, インパルス」, 岸本卯一郎, 向畑恭男訳 吉岡書店(1970)
5. 渡辺昭:「膜の生物物理」(日本生物物理学会編)生物物理学講座 9, 77 吉岡書店(1966)
6. Kishimoto, U.: *Advan. in Biophys.*, 3, 199 (1972).
7. 大川和秋, 岸本卯一郎:投稿準備中
8. 岸本卯一郎:投稿準備中
9. Falk, G., P. Fatt: *Proc. Roy. Soc. (London)*, B, 160, 69 (1964)
10. Matsumoto, N., I. Inoue, U. Kishimoto: *Jap. J. Physiol.*, 20, 516 (1970).
11. Hodgkin, A. L., A. F. Huxley, B. Katz: *J. Physiol.*, 116, 424 (1952).
12. Adrian, R. H.: *J. Physiol.*, 151, 154 (1960).
13. 大川和秋, 井上勲, 岸本卯一郎:未発表 (1970).
14. Cole, K. S., H. J. Curtis: *J. Gen. Physiol.*, 22, 37 (1938).
15. Kishimoto, U.: *Plant and Cell Physiol.*, 9, 539 (1966).
16. 要約に Hope, A. B.:「イオン輸送と生体膜——その生物物理学——」共立出版。(東京) (1972).
17. 大川和秋, 岸本卯一郎:未発表
18. Nagai, R., U. Kishimoto: *Plant and Cell Physiol.*, 5, 21 (1964).
19. Cole, K. S., J. W. Moore: *J. Gen. Physiol.*, 44, 123, (1960).
20. Moore, J. W., K. S. Cole: *Physical Techniques in Biological Research* (ed. W. L. Nastuk). 6, 263, Academic Press Inc., New York. (1963).
21. Blinks, L. R.: *J. Gen. Physiol.*, 19, 633 (1936).
22. Blinks, L. R.: *J. Gen. Physiol.*, 19, 869 (1936)
23. Blinks, L. R.: *J. Gen. Physiol.*, 20, 229 (1937).
24. Lorente de No, R.: *A Study of Nerve Physiology. Studies from Rockefeller Inst.*

- for Med. Res., 131, 132, (1947).
25. Hodgkin, A. L., A. F. Huxley: *J. Physiol.*, 117, 500 (1952).
26. 萩原進, 渡辺昭: 「日本生理誌」, 17, 第3号, 131頁 (1955).
27. Hisada, M.: *J. Cell and Comp. Physiol.*, 50, 57 (1957).
28. Chang, J. J.: *J. Cell and Comp. Physiol.*, 56, 33 (1960).
29. Eckert, R., T. Sibaoka: *J. Gen. Physiol.*, 52, 258 (1968).
30. Mueller, P.: *J. Gen. Physiol.*, 42, 137 (1958).
31. Mueller, P.: *J. Gen. Physiol.*, 42, 163 (1958).
32. Stämpfli, R.: *Helv. Physiol. Acta.*, 16, 127 (1958).
33. Lüttgau, H. C.: *Pflügers Archiv.*, 271, 613 (1960).
34. Segal, J. R.: *Nature*, 182, 1370 (1958).
35. Moore, J. W.: *Nature*, 183, 265 (1959).
36. Tasaki, I.: *J. Physiol.*, 148, 306 (1959).
37. Mueller, P.: *J. Gen. Physiol.*, 42, 193 (1958).
38. Ehrenstein, G. P., D. L. Gilbert: *Biophys. J.*, 6, 553 (1966).
39. Reuben, J. P., R. Werman, H. Grundfest: *J. Gen. Physiol.*, 45, 243 (1961).
40. Kishimoto, U.: *Plant and Cell Physiol.*, 7, 429 (1966).
41. Saddler, H. D. W.: *J. Memb. Biol.*, 5, 250 (1971).
42. 岩崎尚彦, 岸本卯一郎: 「日本植物学会, 第33回大会予稿集」 81頁 於熊本 (1968年11月)
43. Inoue, I., Y. Ishima, H. Horie, T. Takenaka: *Proc. Jap. Acad.*, 47, 549 (1971).
44. Takenaka, T., I. Inoue, Y. Ishima, H. Horie: *Proc. Jap. Acad.*, 47, 554 (1971).
45. 岩崎尚彦: 「日本植物生理学会 1973年度講演要旨」 180頁 於東京 (1973年3月)
46. Takahashi, K., S. Miyazaki: *Science*, 171, 415 (1971).
47. Miyazaki, S., K. Takahashi, K. Tsuda: *Science*, 176, 1441 (1972).
48. 浅井一視, 岸本卯一郎: 「日本植物生理学会 1973年度年会講演要旨」, 184頁 於東京 (1973年3月)
49. Kishimoto, U., M. Tazawa: *Plant and Cell Physiol.*, 6, 529 (1965).
50. Steinhardt, R. A., L. Lundin, D. Mazia: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 2426 (1971).
51. Steinhardt, R. A., S. Shen, D. Mazia: *Exptl. Cell Res.*, 72, 195 (1972).
52. Steinhardt, R. A., D. Mazia: *Nature*, 241, 400 (1973).
53. Kitasato, H.: *J. Gen. Physiol.*, 52, 60 (1968).
54. Tazawa, M., U. Kishimoto: *Plant and Cell Physiol.*, 5, 45 (1964).
55. Kishimoto, U.: *J. Cell and Comp. Physiol.*, 66, 43 (1965).
56. 大川和秋, 岸本卯一郎: 未発表
57. 大川和秋, 井上勲, 岸本卯一郎: 未発表 (1971年)
58. Takenaka, T., S. Yamagishi: *Proc. Jap. Acad.*, 42, 521 (1966).
59. Kishimoto, U.: *Plant and Cell Physiol.*, 7, 559 (1966).
60. 岸本卯一郎: 「生体高分子とイオン」, 化学増刊, 37, 219. 化学同人, (東京) (1968).
61. 浅井一視, 岸本卯一郎: 「日本植物学会第37回大会」 於 名古屋 (1972).
62. Frankenhaueser, B., A. L. Hodgkin: *J. Physiol.*, 137, 218 (1957).
63. Tasaki, I., S. Hagiwara: *J. Gen. Physiol.*, 40, 859 (1957).
64. Tasaki, I., A. Watanabe, L. Lerman: *Am. J. Physiol.*, 213, 1465 (1967).

訂正

Vol. 13 No. 4 (通巻68) 25頁表1.

tRNAの構造と反応(瀬野倅二)に以下の誤りがありました。訂正しておわび申し上げます。

誤		正	
Met	パン酵母	Met	パン酵母
Phe	大腸菌	Phe	大腸菌
	パン酵母		パン酵母
	麦 芽		麦 芽
	大腸菌		大腸菌
Pro	トルラ酵母※)	Pro	トルラ酵母※)
Ser	ビール酵母	Ser	ビール酵母
	ネズミ肝		ネズミ肝
Thr	大腸菌	Thr	大腸菌
Trp	大腸菌※)	Thr	大腸菌※)
	ビール酵母	Thp	ビール酵母
Tyr	大腸菌		大腸菌
	パン酵母	Tyr	パン酵母