平滑筋細胞膜の単一カリウム電流

目 片 文 夫*

1. はじめに

電気生理学の分野では、細胞膜の電気的性質をしらべるためには、細胞膜を通過する各種イオンの電流量の正確な値の測定が必要である。従来行なわれてきた膜電位固定法による電流測定は、1個の細胞の細胞膜全域を通過する電流をみてきた。ところが、1970年代後半 Neher 等のグループが開発したパッチクランプ法は、1個の細胞の細胞膜に数千個存在すると思われるイオンチャンネルの、1個1個のチャンネルを流れる電流の測定を可能にした。この方法は、今日まで多くの興奮性細胞膜、非興奮性細胞膜に適用されている。平滑筋の分野においても、Bolton¹⁾のグループや Singer²⁾のグループが、内臓平滑筋細胞の研究にこの方法を取り入れて以来、多種の平滑筋の細胞膜のチャンネル研究に、パッチクランプ法が使われるようになった。従来の平滑筋の電気生理学の研究水準は、平滑筋の細胞が小さいことや、細胞構築の複雑さのため、他の筋肉細胞、骨格筋や心筋に比べて遅れているところがあった。しかし、このパッチクランプ法は、細胞の小さいことや複雑な構築が、実験遂行上の困難さに殆んど影響を及ぼさないため、平滑筋の分野において、現在、急速にこの方法を使う研究者が増えている。

パッチクランプ法には、主なものとして inside-out パッチ、outside out パッチ、whole cell パッチ、cell attached パッチがあるが、このうち inside out パッチと outside out パッチは、パッチクランプ法の本来の目的である単一イオンチャンネル電流を測定する手段である。whole cell パッチと cell attached パッチは、1個の細胞の総電流量を測定する方法であり、単一チャンネル電流を測定することはできない。平滑筋の分野では、これらのうちで inside out パッチが最もよく使われている。これは、inside out パッチが他の3つの方法に比べ、実験遂

行が技術的に最も容易なためである。

現在までに報告されている、平滑筋細胞膜の単一チャンネル電流のほとんどは、 K^+ 電流である。 K^+ 電流以外では、 Na^+ 電流と思われるものが腸や腸間膜動脈の平滑筋において記録されているが、その発生頻度が小さく、現在のところ、まだ Na^+ 電流としての確認が行なわれていない³⁾。 K^+ 電流については、 $[K]_i : [K]_o$ の K^+ の濃度勾配から算出される平衡電位の理論値と、実測された K^+ の平衡電位の値の一致から、 K^+ 電位であることが確かめられている^{1), 4)}。単一 K^+ 電流は、どの平滑筋組織においても、2種類のものが存在しているようである。これら2つの K^+ チャンネルは、コンダクタンスの大きさが異なる。生理的 $[K]_o : [K]_i$ 勾配下において膜電位0の時、門脈平滑筋では130pSと50pS⁴⁾、腸平滑筋では100pSと50pS¹⁾、胃平滑筋では200pSと100pS⁵⁾の、大きな値をもつ K^+ 電流 (K_L) と小さな K^+ 電流 (K_S) が存在する。 K_L および K_S のコンダクタンスは、 $[K]_o : [K]_i$ 勾配と $[Ca]_i$ が生理的条件下では電位依存性を持ち、脱分極方向ではコンダクタンスの増加がみられる。また、これらのチャンネルの“開”確率 P_o も、脱分極とともに増大する。このようなチャンネル電流の電位依存性は、 K_L よりも K_S の方が一般には顕著である。 K_S チャンネルは $-40mV$ より負電位で“閉”の状態から、急速に膜電位を正方向に移されると、チャンネル“開”となるまでに数秒を要する⁶⁾。 K_L チャンネルに関しては、このような遅延は報告されていない。

門脈平滑筋では、上記のような生理的条件下では、膜電位が静止電位の水準 ($-40mV \sim -50mV$) に保たれると、 K_L も K_S もほとんどが発生しなくなる⁴⁾。他の平滑筋組織でも同じ条件下では、 K_L 、 K_S の発生は強く抑えられる。この結果から、 K_L 、 K_S 両チャンネルは、静止電位を維持するチャンネルではないとい

*Fumio MEKATA, 京都大学霊長類研究所生理部門 (484 愛知県犬山市官林)

図1 確率密度関数 左側の棒線グラフは (ある一定の open life time をもつ単一“開”チャンネルの数)/(総“開”チャンネルの数)を示す。この一定の open life time の区分の時間を0に近づけると棒線グラフは図中に示すような曲線に近づく。本文中の $F_o(t)$ は時間0軸と t 軸および曲線で囲まれた面積を、 $F_o'(t)$ は時間 t より右側の面積を表わす。

う考え方もされている。そこで、この点について検討するために、腸平滑筋の whole cell の入力抵抗 ($2.5 \sim 5.0 \text{ G}\Omega$)⁶⁾ を、同じ組織から得られた単一 K_L 電流の値と比べてみる。腸平滑筋の平均直径と長さをそれぞれ $2 \mu\text{m}$ 、 $500 \mu\text{m}$ とし、このチャンネルの“開”確率を P_o 、 $1 \mu\text{m}^2$ の膜内に3個のチャンネルが含まれるとすると、入力抵抗は $10^6 / 3P_o \Omega$ となる。したがって、 P_o の値が $0.7 \sim 1.3 \times 10^{-4}$ 程度の小さな値でも、このチャンネルが静止電位を維持することが可能となる。 K_L 、 K_s チャンネルが、静止電位の維持に関与していないと結論するためには、厳密なかつ多例数の実験により、 K_L 、 K_s が -40mV 以下の膜電位において、発生頻度が極端に小さいことを確かめる必要があろう。

2. Ca^{++} の効果

いずれの種類の平滑筋も、程度の差はあるものの、

K_L チャンネルの P_o は、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ の上昇に伴って増加する。門脈平滑筋の P_o は、膜電位を -40mV の水準でしらべてみると、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ が $10^{-9} \sim 10^{-8}\text{M}$ ではほとんど零である。 $[\text{Ca}^{++}]_i$ が 10^{-7}M をこえると P_o は急に増大し、はじめ 10^{-6}M $[\text{Ca}^{++}]_i$ では0.6にまで到する⁴⁾。腸間膜動脈や腸の平滑筋でも、似かよった結果が得られている。 K_s チャンネルの $[\text{Ca}^{++}]_i$ 依存性は平滑筋の種類により異なる。胃、腸間膜動脈、腸の平滑筋細胞では、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ の変化は K_s のコンダクタンや P_o に影響を及ぼさない。しかし門脈平滑筋では、 $[\text{Ca}^{++}]_i$ の上昇は P_o の増加を伴う。 $[\text{Ca}^{++}]_o$ はどの平滑筋の K_L 、 K_s にも、大きな効果を持たない。 K_L チャンネルは、他の多くの細胞においてみつけられている。Ca-activated K チャンネルとコンダクタンス値などもよく似かよっており、恐らく同種のチャンネルであろうと考えられている。

図2 振幅分布関数 横軸, y , は記録された単一チャンネル電流の振幅。振幅の最大値は1, 最小値が0。縦軸, $f(y)$, は y の値をもつ単一チャンネル電流発生確率。左図において, a, b が小さくなると $f(y)$ の山がとがる。右図において $a > b$ の時は $f(y)$ の頂点の位置は右方向に, $b < a$ の時は左方向に移動する。

3. チャンネルカイネティクス

薬物やイオンの単一チャンネル電流に及ぼす効果をしらべる時, コンダクタンスや P_o の変化はみやすいが, その他の情報として, チャンネルの開閉の速さを決める速度定数 (α, β) がある。

α, β の値の算出には, チャンネルカイネティクスが必要である。

まず最初に一定時間, 普通は1~数秒間に記録されるチャンネル“開”の個々の開時間(t_o)とある定められた t_o をもつ単一チャンネル電流の発生確率 $f_o(t)$, が実測される(図1)。いま時間0から時間 t までの間, 閉じることなく“開”の状態にあったチャンネルが時間 $(t + \Delta t)$ までに閉じる確率は $\alpha \Delta t$ で示される。 α は単位時間当りの開いていたチャンネルが閉じる割合でもある。(時間0から時間 t まで閉じることのなかったチャンネルの数)/(時間0から時間 ∞ までの間に“開”となるチャンネルの総数)を $F_o'(t)$ で表わすと,

$$F_o'(t + \Delta t) - F_o'(t) = \alpha F_o'(t) \Delta t \quad (1)$$

両辺を Δt でわり, $\Delta t \rightarrow 0$ として微分型にすると,

$$\frac{dF_o'(t)}{dt} = -\alpha F_o'(t) \quad (2)$$

$t=0$ の時, $F_o'(t)=0$ の初期値を入れる。

$$F_o'(t) = e^{-\lambda t} \quad (3)$$

開時間が t よりも小さいチャンネルの確率を $F_o(t)$ を表わすと,

$$F_o(t) = 1 - F_o'(t) = 1 - e^{-\alpha t} \quad (4)$$

$$f_o(t) = dF_o(t)/dt = \alpha e^{-\alpha t} \quad (5)$$

確率密度関数, $f_o(t)$ が式(5)の型をとるのは, 式(1)において, 「開いているチャンネルが一定時間後に閉じる割合が一定である」と仮定したところにある。しかし, この仮定はなんらの理論的根拠もない。それ故, 実験によりこの仮定が正しいことを証明しなければならない。腸平滑筋において, この点が詳し

くしらべられている¹⁾。腸平滑筋での結果は、少なくとも“開”については $f_o(t)$ は t に対し単一の指数関数の曲線により表わされることができ、上記の仮定は妥当なものであったと思われる。チャンネル“閉”のカイネティクスも、式(5)と同様、 $f_c(t) = \beta e^{-\beta t}$ で表わされるが、腸平滑筋から得られた結果は、 $f_c(t)$ は単一の指数関数曲線では表わされず、少なくとも3つの指数曲線が必要である。したがって、少なくともチャンネル“閉”の状態は1つの型をとると云う仮定は誤っている。また、どのような退衰曲線も、指数曲線を3つ組合わせれば当てはめることができるということも、しばしば経験することであり、“閉”に関するカイネティクスは、今後再考の余地があるのかもしれない。

4. Ba⁺⁺の効果

微小電極法等の従来の方法による研究により、外液にBa⁺⁺を投与すると、膜のK⁺コンダクタンスが抑えられることが知られている。そこでBa⁺⁺の効果がパッチクランプ研究においてもしばしばしらべられている。inside out パッチにおいて、電極側すなわち細胞外側にBa⁺⁺を投与しても、全く効果はない。一方、Ba⁺⁺を細胞内側に投与すると、 P_o は著明に減少する。 $[Ba^{++}]_i$ はコンダクタンスにはほとんど影響しないが、 $[Ba^{++}]_i$ が5 mM以上になると、コンダクタンスの減少効果が少し現われる。これ等、単一チャンネル上へのBa⁺⁺の効果は K_L , K_s の両チャンネルに同じ程度に発揮される。Ba⁺⁺のK⁺チャンネルの P_o に対する効果は、著明な電位依存性を示す。腸平滑筋と腸間膜平滑筋の細胞において、Ba⁺⁺の K_L チャンネル電位に対する効果が詳しくしらべられている³⁾。

Ba⁺⁺はチャンネル“開”の時だけチャンネルに作用し、かつBa⁺⁺によるブロック状態は1つの型だけをとると仮定すると、

式(6)の解離定数、 $K_D (= \frac{k_1}{k_{-1}})$ はBa⁺⁺の存在時、不在時のそれぞれの“ P_o ”値を知ることにより求められる。

P_o , P_c はBa⁺⁺不在時の P_{oBa} , P_{cBa} はBa⁺⁺存在時の各々の値。 P_{Ba^*} はBa⁺⁺存在時のブロック状態をとる確率。

$$K_D = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[Ba^{++}] \cdot P_o}{P_{Ba^*}} \quad (7)$$

$P_o + P_c = 1$, $P_{oBa} + P_{cBa} + P_{Ba^*} = 1$ 。また仮定により、Ba⁺⁺は“開”チャンネルだけに作用する。したがって、 β , α の値はBa⁺⁺により影響されない。故に $P_o/P_c = P_{oBa}/P_{cBa} = \beta/\alpha$ 。これ等の関係式を使って、式(7)を $[Ba^{++}]$, P_{oBa} , P_o だけで表わすと、

$$K_D = \frac{[Ba^{++}] \cdot P_{oBa} P_o}{P_o - P_{oBa}} \quad (8)$$

式(8)に $[Ba^{++}]$, P_{oBa} , P_o の実測値を入れることにより、 K_D 値が求められる。

腸平滑筋では、125mM[K]_i: 125mM[K]_o下で0電位において、 K_D は 7.3×10^{-5} Mである。この K_D 値は強い電位依存性を示す。すなわち、負電位側では K_D の増大、正電位側では減少する。 K_D 値は電位の増加（正方向）に対し、指数関数的に減少する。Johnson等³⁾による速度定数の電位依存性に関する理論から

$$K_D(V) = K_{D, V=0} \cdot \exp \left[\frac{(-Z \delta F V)}{(RT)} \right] \quad (9)$$

が成立する。ここで V は膜電位、 $K_{D, V=0}$ は0電位時の K_D , Z はブロックイオンの価電。この式に K_D と V の実測値を入れることにより δ が求められる。腸平滑筋では δ は0.96である。これはBa⁺⁺の作用部位がチャンネルの全長の細胞内から96%のところに依存することを示している。

Beham等は、腸平滑筋細胞ではBa⁺⁺の作用部位は、細胞内側から外側近くまでのチャンネルの95%をしめているとしている。結論として、平滑筋組織にBa⁺⁺を投与した時の P_K の抑制効果は、以下のような形で表わされると考えられる。細胞内外のBa⁺⁺はCaチャンネルを通り細胞内に入り、細胞の内側から再び K_L , K_s チャンネル内に入りチャンネル内の比較的細胞外側に近い部位に存在する作用部位と反応し、 α , β に影響することなく、 P_o を抑えることにより P_K 減少に導く。inside out パッチでは、外液中のBa⁺⁺が全く効果を発揮しないのは、inside out パッチではCa⁺⁺チャンネルが存在しないという事実により説明できる。

5. テトラエチルアンモニウム(TEA)の効果

従来の微小電極法による研究より知られているTEAの効果は、活動電位を有する平滑筋では、①膜の脱分極、②膜抵抗の増大、③Ca-活動電位の振幅の増大とdurationの増加である。またCa-活動電位の下降相は、Ca⁺⁺-依存性の遅延整流K⁺電流より構成されていると考えられている。活動電位をもたない大動脈平滑筋や気管平滑筋に対しては、TEAはslow wave様の活動電位を発生させる能力をもっている。パッチクランプ研究での実験結果をまとめると、以下のである。門脈平滑筋⁴⁾では、K_Lチャンネルのコンダクタンスは、0.1mM[TEA]_oにより約半分に減少する。細胞内のTEA(最大3mM)は、このような効果はない。しかし、腸間膜動脈や腸の平滑筋³⁾では、1mM[TEA]_iはK_Lチャンネルのコンダクタンスを半減させる効果をもっている。K_sに対しては、門脈ではTEAはコンダクタンスには全く効果をもたない(外液; 最大10mM, 内液; 最大1mM)。腸や腸間膜動脈の平滑筋では、1mM[TEA]_iはK_Lコンダクタンスと同様、K_sコンダクタンスの減少効果をもつ。また胃平滑筋⁵⁾では、10mM[TEA]_iはK_L、K_s両方のコンダクタンス減少をひきおこすが、その効果はK_LよりもK_sの方が大きく現われる。

いずれの平滑筋細胞においても、TEAがその効果を現わす時は、常に“開”状態でのノイズの頻度の増大がみられる。そこで、TEAの単一チャンネルのコンダクタンス減少効果は、単一チャンネルのコンダクタンス自体には変化はなく、むしろ速度定数、 α 、 β の上昇によりコンダクタンス減少が生じていると考えられている。これについては、Yellenが理論的に簡潔に以下のように示している。

単一チャンネル電流のみかけ上の大きさ y と、(y の値をもつチャンネルの数)/(総チャンネル数)、 $f(y)$ の関係は、振幅密度関数として表わされる。 $f(y)$ は記録装置の装置関数、すなわち装置のフィルターの時定数とStochastic過程、すなわち α と β の関数として表わされる。いま、フィルターを最も単純な一次の型をとると仮定すると、

$$\frac{dy}{dt} = -(y-c)/\tau \quad (10)$$

Cはフィルターの入力値、 τ はフィルターの時定数。 $t=0$ において c を0にとる、すなわちチャンネルが“開”なっていると、

$$\frac{dy}{dt} = -\frac{y}{\tau} \quad (11)$$

$t=0$ での(y と dy の間に含まれるチャンネル数)/(総チャンネル数)は、 $f(y)dy$ で表わされる。 dt 時間後の y と dy の間に含まれるチャンネルの割合は、 $f(y+dy) \cdot \delta(y+dy)$ 。(ここで $\delta y = \frac{y}{\tau} dt$)。そこで $t=0$ と dt 時間後とでの上記チャンネルの割合の差は、

$$df(y)dy = f(y+dy)\delta(y+dy) - f(y)\delta(y) \quad (12)$$

式(11)に $\delta y = \frac{y}{\tau} dt$ を代入すると、

$$df(y)dy = df(y)\delta(y) + f(y)d(\delta y) + df(y)d\delta(y) \quad (13)$$

ここでも右辺の第3項は、無視できるほど小さいので除去し、両辺を $dt \cdot dy$ でわる。

$$\frac{df(y)}{dt} = \frac{d}{dy} \left[f(y) \frac{y}{\tau} \right] \quad (14)$$

一方、 $t=0$ において $c=1$ 、すなわちフィルターが“開”の状態をとると式(9)は、

$$\frac{dy}{dt} = -(y-1)/\tau \quad (11')$$

次いで式、

$$\frac{df(y)}{dt} = \frac{d}{dy} \left[f(y) \frac{y-1}{\tau} \right] \quad (14')$$

いま、チャンネル“開”の $f(x)$ 部分を $f_o(y)$ 、“閉”の部分をもつ $f(y)$ と表示すると、

$$f(y) = P_o f_o(y) + P_c f_c(y) \quad (15)$$

時間0から dt 時間内に“閉”から“開”へ移動した($y, y+dy$)内にあるチャンネルの割合は、 $dP_c f_c(y) dt$ 。逆に“開”→“閉”方向に移った割合は、 $\beta P_o f_o(y) dt$ となる。そこで、式(14)は次のように変更される。

$$\frac{d}{dt} [P_c f_c(y)] = \frac{d}{dy} [P_c f_c(y)/\tau] - \alpha P_c f_c(y) + \beta P_o f_o(y) \quad (16)$$

同様に $P_o f_o(y)$ についても、

$$\frac{d}{dt} [P_{fo}(y)] = \frac{d}{dy} [P_{fo}(y)(y-1)/\tau] - \beta P_{fo}(y) + \alpha P_{cb}(y) \quad (16')$$

式 (14), (15), (15') から,

$$f(y) = y^{a-1} (1-y)^{b-1} / B(a, b)$$

ここでの $a = \alpha \tau$, $b = \beta \tau$, $B(a, b) = \int_0^1 y^{a-1} (1-y)^{b-1} dy$. いま, α, β が同じ値をとるとすると, a (または b) の値が 1.5 以下の時, $f(y)$ 曲線は y が 0 と 1 で頂点をもつ. 一方, a (または b) が 1.5 以上の時は, y が 0.5 のところで $f(y)$ の頂点が生じる. それ故, 単一イオンチャンネルの正確な電流値の測定のためには, a (または b) が 1.5 以下であることが必要である. 我々の使用しているパッチクランプ増幅器の high cut 値は, 0.2 sec ~ 1 msec である. また, 多くの平滑筋の α, β は 50 ~ 200 である. その結果 a (または b) は 0.01 ~ 0.2 となり, 通常の状態では平滑筋の単一チャンネル電流の振幅は正しい値が記録されている. これが問題となるのは, high cut が 1 msec の場合, "開" チャンネル時間 ($1/\alpha$) または "閉" チャンネル時間 ($1/\beta$) が 0.13 msec 以下になった時であり, この時は単一チャンネル電流は実際の値の半分になる.

6. Na^+ の効果

Singer 等は, 胃平滑筋細胞の K_L 電流に対する $[Na^+]_i$ の効果をみている. この組織での K_L 電流の $V-I$ 曲線は, 大きな電位範囲にわたり直線性を示す. しかし, 細胞内に 20 mM Na^+ が存在すると, $V-I$ 曲線は -40 mV から +20 mV の範囲内では直線を保つが, +30 mV をこえるとコンダクタンスは低下しはじめ, +40 mV より正方向では, スローコンダクタンスは負の値をとる. このような Na^+ の正電位側でのコンダクタンス減少は, 神経細胞や平滑筋細胞の whole cell の実験でもみられている. このコンダクタンス抑制効果は, TEA の場合と同様, α, β の増大によっていると考えられている.

微小電極法等の従来の研究方法により得られた結論によると, 平滑筋のスパイク様活動電位は Ca^{++} 活動電位であり, その下降相は Ca^{++} -activated 遅延 K 電流の増加によるものとされている. 平滑筋の slow wave 様活動電位は, 膜電位固定実験の結果から,

P_K の変動によっているとの考えが出されている. パッチクランプ実験と微小電極法等の従来の実験結果とを比較すると, K_L チャンネルはスパイク様の活動電位の下降相に, K_L チャンネルは slow wave 様の活動電位の下降相に, 関与しているとするように説明がつく.

7. あとがき

平滑筋のパッチクランプ法による単一イオンチャンネルの研究は, まだその緒についたばかりである. しかしその一方で, すでにこの研究は一段落した感もある. とくに K^+ チャンネルについては, その傾向が強い. 現在, 平滑筋のパッチクランプ研究は, その主体はすでに K^+ の単一チャンネルをはなれ, cell attached パッチを使った Ca^{++} チャンネルの研究や, whole cell パッチによる膜電位固定法の研究に移っている. Ca^{++} 電流については, inside out や outside out パッチのような微小膜片では, この Ca チャンネルは消失すると考えられており, 単一 Ca 電流の測定は困難なようである. これまでに, 新しい研究手段が平滑筋の電気生理学の分野に入ってきた時 (たとえば微小電極法, 隔絶箱法, 蔗糖隔絶法等), 扱う平滑筋の種類を次々とかえて, 研究対象の幅を横に拡げるにより進められた. これは, 平滑筋が筋肉の分類の 1 つにまとめることが困難なほど組織特異性が強く, 個々の種類の平滑筋の研究が意義があった. しかし, 単一チャンネルを研究の指標としてみると, 平滑筋内の異なる組織間はもちろんのこと, 平滑筋以外の細胞と比較しても, 少なくとも K チャンネルについては, 本質的な差異はなさそうである. チャンネルレベルでは差異がないにもかかわらず, なぜ一個の細胞レベルになると, 組織特異性が現われてくるか興味のあるところである.

文 献

- 1) Benham, C. D. & Bolton, T. B. : J. Physiol., 340, 469-486 (1983)
- 2) Singer, J. J. & Walsh V. Jr : Biophys. J., 45, 68-70 (1984)
- 3) Benham, C. D., Bolton, T. B., Lang, R. J. & Takewaki, T. : Pflugers Arch., 403, 120-127 (1985)
- 4) Inoue, R., Kitamura, K. & Kuriyama, H. :

- Pflugers Arch., 405, 173-179 (1984)
- 5) Berger, W., Grygorcyk, R. & Schwarz, W.
: Pflugers Arch., 402, 18-23 (1984)
- 6) Benham, C. D., Bolton, T. B., Lang, R. J.
& Takewaki, T. : Experientia, 41, 887-894
(1985)
- 7) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. : Single-
Channel Recording (ed. by Sakmann, B. &
Neher, E.) Plenum Press (1983)
- 8) Johnson, F. H., Eyring, H. & Polissar, M.
J. : The Kinetic Basis of Molecular Biology,
John Wiley & Sons, INC. (1953)