蛍光を用いた生体膜のイオン透過性の測定

——筋小胞体ベシクルの研究から——

布 垣 一 幾 葛 西 道 生

大阪大学基礎工学部生物工学科 〒560 豊中市待兼山町 1-1

Measurement of Ionic Permeability in Biomembrane Vesicles by Fluorescence Method

—Examples in Investigation of Sarcoplasmic Reticulum—

Kazuki Nunogaki, Michiki Kasai

Department of Biophysical Engineering, Faculty of Engineering Science,
Osaka University, Toyonaka, Osaka 560

Application of four fluorescence techniques to the measurement of the passive ionic permeability in biomembrane was demonstrated with the examples in the investigation of sarcoplasmic reticulum vesicles, in which fluorescence technique has widely been employed as well as other techniques, e.g., radio isotope tracer method, volume change-light scattering method, and conductance measurement using artificial planar bilayer membrane.

First, the chlortetracycline method was described. The change in the amount of the intravesicular divalent cations can be followed by measuring the fluorescence of the dye, which increases upon binding to diamagnetic cations such as Ca^{2+} and Mg^{2+} on membrane surface. Secondly explained was the technique using anilidonaphthalenesulfonate, whose fluorescence change arises from its binding to the membrane that depends on the membrane surface potential, and indicates the change in the ionic compositions outside and inside the vesicles. Thirdly, application of the slow response of the potential-sensitive dyes was described. Permeability of ions can be determined from the amplitude and its dissipation rate of transmembrane diffusion potential due to ionic concentration gradient. Lastly, the fluorescence quenching method was shown to give the highest time resolution. The decrease of the fluorescence of the water soluble dyes entrapped in the vesicles due to the influx of ionic quenchers is analyzed to yield the ionic permeability of the vesicles.

Key words: Ionic permeability, Sarcoplasmic reticulum vesicles, Chlortetracycline,
Anilidonaphthalenesulfonate, Potential sensitive dyes, Fluorescence quenching.

1. 二価カチオンキレート色素による測定
 2. 疎水性膜結合色素による測定
 3. 膜電位応答性色素による測定
 4. 蛍光消光法による測定
-

神経軸索の興奮伝達に典型的にみられるように¹⁾, 様々な細胞や細胞内器官において, 生体膜のイオンチャネルのイオン透過性の変化は, 生体機能の発現に重要な役割を果たしている²⁾. イオン透過性による電流は, 大きな細胞では従来から微小電極で測られ, 最近ではパッチクランプ法が発達し³⁾, 微小膜領域での測定が可能になって

きた。しかし、さらに小さいか形状が複雑なためにそれらが適用できない場合や、多数の細胞の同時測定、あるいは生化学的手法の併用が可能な単離膜ベシクルでの測定などには、種々の光学的方法が不可欠である^{4,5)}。特に蛍光を使った測定法は多くの長所を備えている。本稿では、単離筋小胞体ベシクルを中心に、蛍光法を用いたイオンチャネルの研究例を紹介する。

骨格筋の筋小胞体 (Sarcoplasmic Reticulum: SR) は、各筋原線維を網目状にとりまく袋状の細胞内器官であり、 Ca^{2+} の能動的取込み^{6,7)}、貯蔵⁸⁾、遊離^{9,10)} の諸機能を備えており、筋線維の収縮弛緩を直接制御する筋細胞内 Ca^{2+} 濃度を調節している¹¹⁻¹³⁾。興奮収縮連関の内で中心的役割を担う SR の Ca^{2+} 遊離機構を解明するうえで、SR のイオン透過性についての知識は不可欠である¹⁴⁾。単離 SR ベシクルは、直径約 100nm の膜小胞で、 Ca^{2+} 濃度勾配遠心によって Ca^{2+} ポンプタンパク (ATPase) を主に含む軽い分画と、 Ca^{2+} 結合タンパクを多く含む重い分画とに分かれる^{15,16)}。SR ベシクルのイオン透過性は、主に①放射性同位元素 (RI) とミリボアフィルターを使った方法¹⁷⁻²⁴⁾、②浸透圧差による体積変化を光散乱強度で検出する方法²⁵⁻³¹⁾、また、③脂質人工平面膜にベシクルを融合させて電気的測定する方法³²⁻³⁴⁾ によって調べられた^{35,36)}。①、②から、SR の透過性は、 Cl^- 、 NO_3^- 、 Na^+ 、 $\text{K}^+ > \text{H}_2\text{O} \gg \text{gluconate}^-$ 、 choline^+ 、 $\text{Tris}^+ > \text{Ca}^{2+}$ 、 Mg^{2+} 、 sucrose の順であること、③から、膜電位に依存して開閉するカチオンチャネルの存在が示されている。①は最も直接的であるが時間分解能が悪く (数十秒)、②は簡単に連続的記録ができるが、間接的であること、水の透過時間 (約 0.1 秒) 以下の測定ができない等の欠点がある。③では、融合したベシクルのみを測るので、試料の全体的性質を反映しているか否かが問題になる。これらの問題を解決するには、測定原理の異なる他の方法が有効である。以下に述べるように、蛍光を用いた 4 つのイオン透過性測定法が SR ベシクルに試みられている。

1. 二価カチオンキレート色素による測定

抗菌性抗生物質の chlortetracycline (CTC) は、二価カチオンと結合することや、特定の生体内組織を染めることが知られていたが、Caswell らはその性質を調べ、CTC が生体膜に結合した二価カチオンのプローブとして使用できることを示した³⁷⁻⁴⁰⁾。

CTC は、二価の反磁性カチオンと一対一に結合してその蛍光強度が増加する。 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 等の常磁性カチ

Table 1 CTC の二価カチオンへの結合

カチオン	溶媒	解離定数 (μM)	水中での解離状態に 対する蛍光増大率
Mg^{2+}	水	267	23
Mg^{2+}	50% methanol	114	66
Zn^{2+}	水	42	10.5
Ca^{2+}	水	440	7.5
Sr^{2+}	水	65	10.7
Mg^{2+}	SDS ミセル	110	101
Mg^{2+}	赤血球膜	370	109
Mg^{2+}	SR 膜	400	207

10 μM CTC, pH 7.4. 380nm で励起し、520nm で観測。カチオンは全て塩化物塩を使用 (文献³⁷⁾ から)。

オンは逆に蛍光を弱くする。Table 1 に、蛍光強度の二価カチオン濃度依存性から求められた量子収率の増大率と、CTC- Mg^{2+} キレートの解離定数を示す³⁷⁾。このキレート形成は、溶媒の極性が小さい程促進され、70% methanol 中では、 Mg^{2+} の解離定数が 24.7 μM 、 Ca^{2+} は 9.0 μM と、さらに親和性が強くなる³⁸⁾。SDS ミセル溶液中では同様の变化があるが (Table 1)、カチオンを結合しない中性の界面活性剤ではみられなかったので、CTC はミセルに結合した Mg^{2+} と結合すると考えられる。赤血球や SR 膜にも同じ効果があるが、0.1M NaCl を加えるとその効果は減少する。これは、 Na^+ が Mg^{2+} と競合して Mg^{2+} の膜への結合量を減らすことによる。もちろん膜のみでは、CTC の蛍光の増大は起こらない。

Jilka らは、SR ベシクルと、SR から DOC で精製した Ca^{2+} -ATPase を再構成したリン脂質ベシクルで、 Ca^{2+} の能動的取り込みと受動的流出を調べた^{41,42)}。ベシクル内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$) と蛍光変化との関係はリポソームで調べられ、 10^{-4} ~ 10^{-3}M で比例していた。CTC で調べた SR ベシクルの Ca^{2+} 取り込みは、他の方法で得られていた結果と一致した。 Ca^{2+} の流出は、 Ca^{2+} を取り込ませたベシクル溶液 (CTC, Ca^{2+} を含む) と等量の EGTA 溶液 (CTC を含む) を高速混合して $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ を下げ、その後の蛍光強度変化から測定された。蛍光減少は三相性で、最初の速い相は外側膜表面に結合していた Ca^{2+} の遊離による。後の二相が内側からの流出を表わし、片対数プロットの初期勾配から見かけの透過速度が求められた。それは、 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ が $5 \times 10^{-5}\text{M}$ の時に最大値 0.04/sec に達した。再構成

Fig. 1 各種透過性測定法に用いられる蛍光色素

ATPase ベシクルでは、タンパク/リン脂質比が高い程流出する Ca^{2+} の量が増え、ATPase が充分組み込まれると、SR ベシクルと同等あるいはそれ以上の流出速度に達する。これらの結果と、種々の RI による流出実験と電顕観察の結果を総合して、ATPase の四量体がチャネルを形成して Ca^{2+} その他の溶質分子を透過させることが示唆された。しかし、この透過が非選択的である⁴¹⁾ことや、ATPase の精製が不完全である可能性³⁵⁾を考えると、これが ATPase の生理機能の一つであると結論するのは早計であろう。

長崎と葛西は、CTC を用いて、SR ベシクルの Mg^{2+} と Ca^{2+} 透過性を調べた⁴³⁾。CTC の蛍光と $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ との比例関係は、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の流出と蛍光変化の曲線が相似であることで確認された。また、使用濃度の CTC は $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の流出に影響しなかった。 Mg^{2+} の流出は、 MgCl_2 中で平衡化した SR ベシクルを CTC と EDTA を含む溶液に 40 倍に希釈して測定した。Fig. 2 に示すように、始め CTC の膜内側への結合による蛍光の増加があり、次いで内側 Mg^{2+} の流出に伴って蛍光は減少する。 MgCl_2 中での平衡化時間の長い程蛍光変化が多い。これから Mg^{2+} 流入の半透過時間 ($t_{1/2}$) が約 6min と求まった。一晩平衡化した時の流出の $t_{1/2}$ は 280sec でそれとほぼ等しく、 Mg^{2+} の透過は可逆的である。各流出曲線は二つの指数関数的減衰に分けられ、それぞれの $t_{1/2}$ は約 100sec と約 1000sec で一定であるが、遅い成分の割合は平衡化時間が長くなると増加し、一晩平

Fig. 2 Mg^{2+} の流出による CTC の蛍光変化

MgCl_2 中で平衡化した SR ベシクルを CTC と EDTA を含む溶液に希釈した後、の蛍光変化 (pH 6.5)。平衡化条件は、(A) 3min, (B) 5min, (C) 30min (以上室温), (D) 4°C で一晩。(E) は、 Mg^{2+} を入れていない SR ベシクルを希釈した時。文献⁴³⁾から。

衡化の場合には速い成分と同じになる。これは、ベシクルには 2 種類あり、約半数は他の半数の約 10 倍の透過性を持つことを示している。 Ca^{2+} の場合も、流出はやはり二相性であった。外液に Ca^{2+} も Mg^{2+} もない場合は、 Mg^{2+} と Ca^{2+} の全流出の見かけの $t_{1/2}$ はほぼ等しく、pH 5.6 で約 500sec なのが pH 8.1 では約 23 sec に減少した。この pH 依存性から、チャネルの輸送部位の見かけの pK が 7.8 と求まり、システイン残基の関与が示唆された。以上の CTC による測定から、二

価カチオンの流出は二相性であることがわかったので、 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ の流出データが二成分を仮定して解析された¹⁹⁾。その結果、約 2/3 のベシクルは速い Ca^{2+} 放出をおこすこと、その放出は、生筋のスキンドファイバーで見られているように^{9,12)}、 μM の Ca^{2+} や mM の caffeine で活性化され、 mM の procaine や Mg^{2+} で抑制されることが示された。

さらに、この方法をストップフロー法と組み合わせて、重い分画の SR ベシクルからのより速い Ca^{2+} の流出が測定された^{36,44)}。 Ca^{2+} の流出速度が高くなると、CTC が内側にとり残されるために蛍光変化が Ca^{2+} の動きより遅れておこることを補正した解析から、 Ca^{2+} の流出は caffeine と ATP によって加速され、最も活性化された時、 $t_{1/2}$ は 20msec にも短縮されることが示された。

2. 疎水性膜結合色素による測定

合成色素 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) は、生体膜の構造を調べる蛍光プローブとして最も広く用いられてきた⁴⁵⁻⁴⁸⁾。その蛍光強度は溶媒の極性に大きく依存し、有機溶媒中では量子収率が水中での値の 100 倍以上にもなる⁴⁹⁾。水溶液中でも、タンパク質や生体膜に結合して蛍光強度が増大する。

Vanderkooi と Martonosi は、SR ベシクルへの ANS の結合と、蛍光の変化を測定し、蛍光強度は膜に結合した ANS の量に比例することを見いだした^{50,51)}。膜タンパクのトリプトファン残基からのエネルギー移動が観察されたので、膜タンパクの近くにも存在するが、脂質分解酵素処理により、蛍光強度、結合量、エネルギー移動がすべて減少したので、脂質の寄与は大きいと考えられた。

ANS と脂質ベシクルとの相互作用は、Haynes と Staerk によって詳しく調べられた^{52,53)}。Phosphatidylcholine (PC) ベシクルへの ANS の最大結合量は PC 4 分子当り 1 分子であった。結合時は蛍光寿命が長く水分子の影響を受けていないこと、 Mn^{2+} による常磁性消光もなかったのでカチオンからも隔離されていることと、分子模型の吟味とから、ANS の結合部位は PC の 4 つの極性基に囲まれた場所であることが示された。PC に phosphatidic acid (PA^-) を混ぜたベシクルで、ANS 結合量の表面電荷依存性、イオン強度依存性等を調べた結果、ANS の結合量は膜の表面電位で決まることがわかった。負の表面電荷が多いと結合は減り、表面電荷がカチオンで遮蔽されたり、二価カチオンが PA^- に結合し

Fig. 3 ANS の膜透過による蛍光変化

KCl と monactin 存在下で、PC ベシクル溶液と ANS 溶液を混合した後の蛍光変化。見えているのは遅い変化で、縦の白線はその変化量を表す。スケールは、縦が 0.2V、横が 0.5sec を示す。文献⁵⁴⁾から。

て表面電荷が減少したりすると結合は増加する。次に、PC ベシクルへの ANS 結合の動的過程が解析された⁵⁴⁾。一価カチオン存在下で、ANS 溶液にベシクルを加えると、Fig. 3 のように、蛍光は即座の増加の後、5~100 sec の時定数で増加する。二つの変化の大きさの比は、ベシクル濃度を下げた極限で外と内の表面積の比に等しいことなどから、速い増加は外側表面への ANS の結合により、遅い増加は ANS が膜の疎水部を透過して内側表面への結合量が増えることによると解釈された。ANS の膜透過は、valinomycin 型の中性キャリア存在下では、一価カチオンとの中性の三分子会合体形成により加速され、その $t_{1/2}$ は 20msec 程度まで短縮できる。

Chiu らは、SR ベシクルに結合した ANS の量子収率が、イオン強度や ANS の結合量等によらないことを確かめた後、Fig. 3 の方法で求めた内外表面への ANS 結合量の K^+ 濃度依存性から、表面電位と表面電荷密度を測定した⁵⁵⁾。求めた表面電荷密度は、軽い分画で脂質 22~28 分子当りに 1 電荷で、SR の脂質組成から計算した値と一致する。また、ANS 結合量の Ca^{2+} 濃度依存性も測定された。これらの知見に基づき、SR ベシクルのカチオン透過性がストップフロー法を用いて測定された⁵⁶⁾。Table 2 に Ca^{2+} の流入測定の結果を示す。まず、実験 6 では Fig. 3 と同様の変化がおり、valinomycin 存在下での ANS の透過時間は 24msec と求まる。実験 1~5 では、内外に ANS 存在下で $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{out}}$ をジャンプさせるので、外側表面への ANS 結合により蛍光は即座に増加する。実験 1~4 では、その後さらに二相性の蛍光増加がある。どちらも Ca^{2+} の流入に

Table 2 ANS による SR ベンクルへの Ca^{2+} 流入の測定

実験	混 合 条 件	速 い 成 分		遅 い 成 分	
		時定数	蛍光変化量 (V)	時定数	蛍光変化量 (V)
1	(SR)vs. (30 mM Ca^{2+})	8 sec	1.0	100 sec	5.0
2	(SR+1/2 val) vs. (30 mM Ca^{2+})	45 msec	0.9	120 sec	5.7
3	(SR+val) vs. (30 mM Ca^{2+})	47 msec	1.0	120 sec	6.0
4	(SR+val) vs. (60 mM Ca^{2+})	21 msec	1.1	70 sec	6.5
5	(SR+val, no K^+) vs. (30 mM Ca^{2+} , no K^+)	—	—	55 sec	5.0
6	(SR+15 mM Ca^{2+} +val, no ANS-)vs. (15 mM Ca^{2+} +2×ANS-)	24 msec	6.0	—	—

指示のない限り、全ての溶媒は、33 μM ANS と 10mM KCl を含む。ただし、val は 14 μM valinomycin, 1/2 val は 7 μM valinomycin, 2×ANS は 66 μM ANS を示す (文献⁵⁶⁾ から)。

よる ANS の内側結合量の増加によるが、遅い成分は常に Ca^{2+} の透過速度を反映しているのに対し、速い成分は場合による。Valinomycin のない実験 1 では、蛍光変化は ANS の膜透過速度に律速されており、 Ca^{2+} 流入に追従していない。実験 2, 3 では、蛍光の $t_{1/2}$ は ANS 流入の $t_{1/2}=24\text{msec}$ より長いので、 Ca^{2+} 流入は ANS 流入と同程度の速さである。以上から、 Ca^{2+} の速い流入の $t_{1/2}$ は 47msec 以下と求まる。この成分は K^+ がないと現われない (実験 5)。 Ca^{2+} の流出は、[EGT A]_{out} をジャンプさせて測定された。 Ca^{2+} 流出に伴って蛍光強度は減少する。2.5mM[Ca^{2+}]_{in}, 10mM K^+ のとき、時定数 0.8sec と 100sec の二成分となり、速い成分は [K^+] や [Ca^{2+}]_{in} が増すと増加する。遅い成分は、[Ca^{2+}]_{out} の増加により阻害定数 4 μM で遅くなる。以上から、 Ca^{2+} の膜透過はチャネルによるのではなく、ATPase の受動的回転による Ca^{2+} -2 K^+ 交換輸送によると解釈された。

KCl 濃度のジャンプにより K^+ の透過性の測定も行われた (Fig. 4)⁵⁶⁾。ANS は K^+ と共に膜を透過するので、ベンクル内外への分配平衡は次式で表わされる。

$$K_{eq} = \frac{[\text{ANS}]_{in} [\text{K}^+]_{in}}{[\text{ANS}]_{out} [\text{K}^+]_{out}} = 1$$

KCl ジャンプで [K^+]_{out} が増すと ANS の内側平衡濃度が増え、ANS が流入して蛍光が増加する。 K^+ が流入してきて [K^+]_{in} が増すと、ANS の内側での結合は促進されるが、上式による ANS の内側平衡濃度の減少が勝って、蛍光は減少する。この減少から K^+ の流入が

Fig. 4 KCl ジャンプによる三相性蛍光変化

ANS, valinomycin 存在下で、SR ベンクル溶液と KCl 溶液を混合した後の蛍光変化。スケールは、縦軸が 0.2V, 横軸は (A) 10msec, (B) 5sec. 文献⁵⁶⁾ から。

測れるが、原理的に ANS の透過より速い過程は測定できない。図のように、 K^+ 透過は二相性で、valinomycin 濃度が低い (0.22 μM) ときは、 $t_{1/2}=2\text{sec}$ の成分が60～70%, $t_{1/2}=100\text{sec}$ が 30～40% を占めた。Valinomycin 濃度を上げる (～6 μM : Fig. 4) と、2成分とも加速されたが、速い成分の $t_{1/2}$ は 175msec で飽和した。この時は、 K^+ の流入が Cl^- の透過に律速されている²⁵⁾。速い成分は、後述する Meissner^{23,24)} のタイプ I に相当し、遅い成分は、タイプ II に相当しアニオンチャネルも持たないと解釈された。Valinomycin によるタイプ II の加速は、KCl イオン対に対するキャリア作用で説明される。

Haynes はさらに、 H^+ の SR 膜透過性を調べた⁵⁷⁾。ANS と valinomycin 存在下で、pH 7.0 からいろいろな pH へジャンプさせると、酸性側では蛍光の増加、アルカリ側では減少が見られた。変化は常に三相性で、

$t_{1/2}$ は 50~250m sec, 2~4sec, 60~200sec であった。最も速い成分と二番目の成分は、それぞれ、 Cl^- と K^+ の透過と共役したタイプ I ベシクルの H^+ 透過であり、遅い成分はタイプ II の寄与であると解釈され、どちらのタイプのベシクルも H^+ チャンネルを持つと結論された。

3. 膜電位応答性色素による測定

Cyanine, oxonol, merocyanine 系の合成色素は、疎水性と電荷を併せ持っているが、それらの蛍光や光吸収は生体膜の電位変化に応じて変化する^{4,5,47,48}。蛍光変化には、数 $10\mu\text{sec}$ で応答するものと、秒程度の応答時間のものがある⁵⁸。速い応答は、色素の膜への吸着や配向等の変化によっておこるもので、上記の全ての色素が示すが、変化量は小さい。Merocyanine 系が比較的大きな ($\leq 0.1\%$) 応答を示すので、単一細胞の膜電位測定に使われている⁵。遅い応答は、色素の膜透過による膜内外への色素の分配によっておこるもので、電荷が非局在化して膜透過性の大きな cyanine 系と oxonol 系でみられ、変化量が大きい (数10%) ので、小さな細胞や膜ベシクルけん濁液での測定に使われている。ここでは、cyanine 系色素の遅い応答による膜電位測定を、イオン透過性の測定に応用した例について述べる。

Hoffman と Laris は、 $\text{diO-C}_8(3)$ を用いてヒトと *Amphiuma* の赤血球の膜電位を測定した⁵⁹。細胞内外の K^+ 濃度差を valinomycin 存在下で与えるか、または Cl^- の濃度差を与えることによる拡散電位で膜電位を変え、蛍光の変化を測った。蛍光強度は、過分極 (内側が負) 側で減少し、脱分極側で増加した。その変化量は、拡散電位に対する Goldman の式から計算した膜電位に (*Amphiuma* の場合は微小電極で測定した膜電位にも) 比例した。このような蛍光変化は、Sims らによって次のように説明された⁶⁰。色素分子は膜を透過できるので、内側が負電位になると細胞内に取り込まれる。細胞内濃度が上がると、色素の二量体や多量体ができ、これらは単量体の蛍光測定条件では蛍光強度に寄与しない。脱分極時は逆の変化が起こる。したがって、応答速度は色素の膜透過速度で決まる。しかし、細胞内色素の消光の機構については未だに定説はない⁶¹。蛍光変化から膜電位を求めるためには、膜内外のイオン置き換えによる拡散電位と蛍光強度の関係を予め実験的に求めておき、校正に用いる。拡散電位は、透過イオンが一種の場合は Nernst の式から、二種以上のときは Goldman-Hodgkin-Katz の式から計算して求める^{4,58}。

McKinley と Meissner は、RI の実験から、SR ベ

Fig. 5 リポソームの膜電位による $\text{diO-C}_8(3)$ の蛍光変化。

K^+ gluconate の入ったリポソームを、 K^+ gluconate, 色素, valinomycin を少量含む Na^+ gluconate 溶液に希釈した時の蛍光スペクトルの変化。励起は 470nm。

(a)はリポソーム添加前、(b)は添加後 3 min 以内、(c)は添加から長時間後、蛍光変化が終わった時。文献²⁴から。

シクルには、 K^+ 、 Na^+ の透過が非常に速いもの (タイプ I) が約70%と、遅いもの (タイプ II) が約30%あることを見だし、さらに $\text{diO-C}_8(3)$ を用いてカチオンの透過性を調べた^{23,24}。この色素の蛍光は、リポソームの存在によって、Fig. 5 のように変化する。495nm の蛍光は、 K^+ の濃度差と valinomycin による内側負の膜電位に反応して減少するが、その後 K^+ と Na^+ との交換により膜電位が解消し、再び増加する。電位校正は、 K^+ を入れたリポソームを K^+ と Na^+ の混合溶液に希釈して行った。蛍光の減少は、希釈液の K^+ 濃度の対数に、したがって膜電位に、比例した。SR ベシクルの膜電位は、Fig. 6 のように測定された。 K^+ の濃度差によって電位が発生するのは K^+ の透過性のみが高いベシクルだから、希釈液が、少量の K^+ の他に、 Tris^+ 、 Na^+ と valinomycin, Tris^+ と valinomycin を含む場合は、それぞれ、タイプ I、タイプ II、両方のタイプが、分極する。蛍光の減少は、色素の流入に律速され、その回復は外側のカチオンの流入に律速されている。三つの場合の、希釈時刻に外挿した蛍光の減少量の比は、RI の実験から期待されるもの (2:1:3) に近かった。また、タイプ I を測る条件で、希釈液の Tris^+ の一部を他のカチオンに置き換えると、そのカチオンに透過性があれば膜電位形成は抑えられることを用いて、タイプ I

Fig. 6 イオンの置き換えによる各種 SR ベシクルの膜電位変化.

K gluconate の入った SR ベシクルを、少量の K gluconate を含む希釈溶液中に 1500 倍に希釈した時の diO-C₅(3) の蛍光変化.

希釈溶液は、(O) Na gluconate または K gluconate, (I) Tris gluconate, (II) Na gluconate + valinomycin, (I + II) Tris gluconate + valinomycin. 温度は 4°C. 文献²³⁾ から 図中の説明の誤りを訂正して転載.

ベシクルのイオン選択性が調べられた. そして, 約 $5 \times 6 \text{ \AA}$ 以下の大きさのカチオンはタイプ I を透過することがわかった. また, タイプ II の測定条件 (Na^+ を置換する) ではすべてのカチオンは透過しなかったことから, それらのカチオンは K^+ と同じチャネルを通ると考えられた. K^+ の透過速度は, 膜電位と $[\text{K}^+]_{\text{out}}$ の対数との関係が約 -90 mV まで直線だったことから, Tris^+ のその 100 倍以上, したがって, $t_{1/2}$ は 1 sec 以下, 透過係数は 10^{-6} cm/sec 以上と見積られた. K^+ チャネルの分布がランダムであるとする, タイプ I とタイプ II の比率が 2 対 1 というのは, チャネルは平均してベシクル当たり 1 個存在する ($50 \text{ 個}/\mu\text{m}^2$) 計算になる^{23,24)}. このことは, 超音波処理でベシクルを小さくした実験²⁴⁾ と, SR ベシクルを可溶性化再構成した⁶²⁾ 実験でも確認された.

Bennet と Dupont は, diS-C₃(5) を用いて, 同様にタイプ II への Na^+ の流入速度を Mg^{2+} 存在下で調べた⁶³⁾. 混入 Ca^{2+} を EGTA で取り除くと加速され, その効果はアルカリ pH で促進された. Ca^{2+} -ATPase による K^+ - Na^+ 交換輸送の可能性が示唆された.

山本と葛西は, diS-C₃(5) を用いて, K^+ の入った SR

Fig. 7 Tris^+ の流入速度の膜電位依存性と Cs^+ による抑制.

200mM K gluconate の入った SR ベシクルを, 200mM (K gluconate + Tris gluconate) 中に 100 倍に希釈した時の Tris^+ 流入速度.

(○) Cs^+ のない時, (●) 50mM Cs^+ 存在下. 文献⁶⁴⁾ から.

ベシクルを, valinomycin と K^+ を含んだ Tris^+ 溶液中に希釈したときの蛍光の回復の初速度を測定して, Tris^+ の流入の電位依存性を調べた⁶⁴⁾. その流入速度は, 負電位の増加に伴い単なる電気泳動効果以上に増大し (Fig. 7), チャネルの開閉の電位依存性が求まった. Cs^+ は外側からこの流入を, 負電位が大きい程強く抑制した. 抑制の電位依存性は, Coronado ら⁶⁵⁾ の人工膜中の電位依存性 K^+ チャネルのそれと一致し, Tris^+ もその同じチャネルを通っていることが示唆された.

Meissner らは, H^+ の透過性もこの方法で測定した⁶⁶⁾. アニオンもカチオンも透過性の低い塩環境で, pH をアルカリ側へジャンプさせると, 内側負の膜電位が形成された. また, 両方のタイプが分極する条件で, 同時に $[\text{K}^+]$ 勾配と逆方向の $[\text{H}^+]$ 勾配を与えると, K^+ の拡散電位形成を完全に抑制することができたので, H^+ チャネルは全てのベシクルに存在すると考えられる. そのとき, K^+ - H^+ 交換による K^+ 電位の解消は, 色素の応答時間 (1~2 sec) 内に完了していたことから, H^+ の透過係数は少なくとも 10^{-3} cm/sec と見積られた.

この方法は, アニオン透過性の測定にも応用された⁶⁷⁾. diS-C₃(5) の蛍光変化は, Cl^- の拡散電位によく比例し

た。Gluconate⁻ から Cl⁻ へ置き換えた時の内側負の膜電位の減少から gluconate⁻ の SR ベンクルからの流出が測定された。その速度は、膜電位に依存し、アニオン輸送阻害剤の SITS^{21,68)} によって抑制された。

4. 蛍光消光法による測定

有機分子の蛍光は、種々の消光剤によって消光される^{69,70)}。励起状態の色素に、消光剤が拡散して衝突することによって蛍光寿命が短縮され、量子収率が減るのが動的消光で、その場合、蛍光強度の逆数が消光剤濃度 (Q) に比例するという Stern-Volmer (以後 S-V と略記) の関係が成り立つ⁷¹⁾。その関係からずれる時は、消光剤の拡散を伴わない消光機構 (いわゆる静的消光) が加わっている。この場合には、蛍光強度の変化は変形 S-V 式:

$$F_0/F = (1 + KQ) \exp(VQ)$$

で表わされる^{45,71~73)}。 F_0 は $Q = 0$ の時の蛍光強度、 K は S-V 定数と呼ばれ動的消光を表す。 V は静的消光の定数で、動的消光のみの場合は $V = 0$ となる。この消光現象は、タンパク質中の蛍光性アミノ酸残基やラベルした色素の露出度やその近傍の微視環境を調べるのに利用されてきた^{72~75)}。消光剤としては、pyridinium⁺、Cs⁺、Tl⁺ 等のカチオン、I⁻、NO₃⁻、CNS⁻ 等のアニオンや、O₂、acrylamide 等の中性分子が使われている。イオン性の消光剤による消光は、イオン強度に影響されるので、注意が必要である⁷³⁾。

Moore と Raftery は、8-amino-1, 3, 6-naphthalene-trisulfonate (ANTS) の蛍光の Tl⁺ による消光を利用して、シビレエイの電気器官から調製した acetylcholine 受容体を含む膜ベンクル⁷⁸⁾ の速いイオン透過性を測定した^{76,77)}。一定のイオン強度の下で、Tl⁺ は S-V 式に従って ANTS を消光した。水溶性の ANTS は、膜への結合は少なく膜をほとんど通らないので、凍結融解法でベンクル内へ取り込ませ、外側の色素はゲル透過で 99.9% 取り除かれた。この ANTS 入りベンクルを、ストップフロー装置で同じイオン強度の Tl⁺ 溶液と急速に混合すると、Tl⁺ が流入して $[Tl^+]_{in}$ が上昇し、ANTS の蛍光強度が減少する。その曲線は、Tl⁺ の流入が Fick の法則に従い ($[Tl^+]_{in} = [Tl^+]_{out} [1 - \exp(-kt)]$)、消光が S-V 則に従うとして、単一成分で解析できた。100 μ M carbamoylcholine で活性化すると時定数 50 msec の速い透過が見られ、アンタゴニストはこれを阻害した。最大活性化時の時定数 (0.7 msec) から、活性化された受容体のイオン透過能が求められ、細胞での

Fig. 8 SR ベンクルへの Tl⁺ の流入による蛍光消光.

100mM KNO₃ 中の SR ベンクルに、100mM Tl NO₃ を混合した後の PTS の蛍光変化。最も上のトレースは、100mM KNO₃ と混合した場合、最も下のトレースは、蛍光の零点を示す。

時間スケールは、(a) 20m sec, (b) 0.2sec, (c) 2sec. 装置の dead time は約 2msec. 文献³⁶⁾参照。

電気生理学的データとの一致をみた。この測定法の時間分解能は、装置の混合時間 (数 msec) のみに制限されており、現在最も速い測定法である。

我々は、この方法を SR ベンクルに適用し、Tl⁺ と I⁻ の透過を測定した^{36,79)}。1, 3, 6, 8-Pyrenetetrakisulfonate (PTS) の蛍光は、Tl⁺ と I⁻ により、それぞれ、S-V 則および変形 S-V 則に従って消光された。PTS は SR 膜を徐々に透過するので、一晩の平衡化でベンクルに入る。逆にゲル透過後漏れ出てくるので、流入実験時のその割合は、平行実験で測定した。Tl⁺ の流入曲線を Fig. 8 に示す。外側にある色素は即座に消光されるので、消光曲線は矢印の高さから始まるはずであるが、混合装置の dead time のため、初めの蛍光減少は観測できない。この消光曲線は、単一の透過時間では表わせなかった。そこで、試料は透過性の異なる数種のベンクルから成り、各ベンクルへの流入は上述の指数関数に従うと仮定して多成分解析を行った。その結果、全時間領域にわたるすべての蛍光変化を、4つの成分で表わすことができた (Fig. 9)。特に最も速い成分は、本方法で始めて直接測定されたもので、しかもこれより速い成分は存在しない。Miller の方法^{32~34)}で求めた 100mM Tl⁺ 中での単一チャンネルコンダクタンスの値約 80pS⁸⁰⁾ から、ベンクル当りチャンネルが1個含まれている時の透過時間は、約 3m

Fig. 9 Tl^+ と I^- の流入の各成分の分布.

各々、3回の異なる調製の試料を用いた実験の結果を示す。透過時間 τ は $1/k$ に等しい。 I^- の流入は、400mM KNO_3 、400mM KI を用いて測定した。文献 36) 参照。

sec と計算され、この成分の時定数とよく一致する。 I^- の流入も同様に測定され、やはり4成分が求まった (Fig. 9)。アニオン透過の阻害剤である DIDS で処理すると、4つの時定数はほとんど変化せず、最も速い成分が減少し、最も遅い成分が増加した。この変化は、定性的に RI による実験結果に一致する^{20,21)}。速いチャンネルを全てブロックされたベシクルは最も速い成分に参与しなくなることを考えると、これは、各ベシクルには速いアニオンチャンネルは1~2個しか含まれていないことを意味する。また、Meissner らが議論しているように²⁴⁾、チャンネルのポアソン分布を仮定すると、最も速い成分の割合から、やはりベシクル当り1~2個のチャンネル分布 (アニオンもカチオンも) が計算される。中間の二つの成分の意味が未だ不明ではあるが、この方法が、人工膜での単一チャンネルの測定とベシクルでの透過性の測定とを結びつけた議論を可能にしたことの意義は大きい³⁶⁾。ここで求めた各成分と、光散乱法で見いだされている電位依存性および Ca^{2+} 依存性カチオンチャンネル^{28-31,64)} との関係は、今後解明されるべき問題である。

以上、SR ベシクルに用いられている蛍光による透過性測定法について述べたが、各々測定原理が異なり、それぞれの特徴 (欠点) を持っているので、限界をよく見極め長所をうまく生かせば、測定の簡便さと相まって、他の生体膜のイオン透過性研究にも有効な手段となるであろう。生筋や、その他の細胞での測定については他の綜説を参照していただきたい^{4,5,13,58,81,82)}。

文 献

- 1) 松本 元:「神経興奮の現象と実体(上, 下)」, 丸善 (1981, 1982)
- 2) 「生体の科学」32巻, 第2号 (1981)
- 3) 吉田 繁:生体の科学, **33**, 157-167 (1982)
- 4) 神野耕太郎:生物物理, **18**, 105-119 (1978); 膜, 神野耕太郎, 広田秋彦, 藤井志郎: **6**, 93-103 (1981)
- 5) J. C. Freedman, P. C. Laris: *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, **12**, 177-245 (1981)
- 6) M. Tada, T. Yamamoto, Y. Tonomura: *Physiol. Rev.*, **58**, 1-79 (1978)
- 7) 山本泰望:生体の科学, **32**, 487-494 (1981)
- 8) 池本憲章:蛋白質核酸酵素, **19**, 1059-1069 (1974)
- 9) M. Endo: *Physiol. Rev.*, **57**, 71-108 (1977)
- 10) 宮本 宏, 米谷忠篤, 葛西道生:生物物理, **19**, 1-10 (1979)
- 11) S. Ebashi: *Ann. Rev. Physiol.*, **38**, 293-313 (1976)
- 12) 遠藤 実:生物物理, **15**, 247-259 (1975)
- 13) 北沢俊雄:生物物理, **19**, 123-129 (1979)
- 14) 遠藤 実:生物物理, **18**, 256-260 (1978)
- 15) D. H. MacLennan, P. C. Holland: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 377-404 (1975)
- 16) G. Meissner: *Biochim. Biophys. Acta*, **389**, 51-68 (1975)
- 17) M. Kasai, H. Miyamoto: *J. Biochem.*, **79**, 1053-1066 (1976)
- 18) *idem.*: *ibid.*, 1067-1076 (1976)
- 19) K. Nagasaki, M. Kasai: *J. Biochem.*, **90**, 749-755 (1981)
- 20) M. Kasai, T. Taguchi: *Biochim. Biophys. Acta*, **643**, 213-219 (1981)
- 21) M. Kasai: *J. Biochem.*, **89**, 943-953 (1981)
- 22) G. Meissner, D. McKinley: *J. Membrane Biol.*, **30**, 79-98 (1976)
- 23) D. McKinley, G. Meissner: *FEBS Lett.*, **82**, 47-50 (1977)
- 24) *idem.*: *J. Membrane Biol.*, **44**, 159-186 (1978)
- 25) T. Kometani, M. Kasai: *ibid.*, **41**, 295-308 (1978)
- 26) M. Kasai, T. Kanemasa, S. Fukumoto: *ibid.*, **51**, 311-324 (1979)
- 27) M. Kasai, T. Kometani: "Nerve Membrane: Biochemistry and Function of Channel Proteins", G. Matsumoto, M. Kotani, ed., pp. 151-164, Univ. Tokyo Press, Tokyo (1981)
- 28) N. Yamamoto, M. Kasai: *J. Biochem.*, **90**, 1351-1361 (1981)
- 29) *idem.*: *ibid.*, **92**, 465-475 (1982)
- 30) *idem.*: *ibid.*, 477-484 (1982)
- 31) *idem.*: *ibid.*, 485-496 (1982)
- 32) C. Miller: *J. Membrane Biol.*, **40**, 1-23 (1978)
- 33) P. Labarca, R. Coronado, C. Miller: *J. Gen. Physiol.*, **76**, 397-424 (1980)
- 34) R. Coronado, R. L. Rosenberg, C. Miller: *ibid.*, 425-446 (1980)

- 35) 山本信行, 葛西道生: 生体の科学, **32**, 479-486 (1981)
- 36) M. Kasai, K. Nunogaki, K. Nagasaki, M. Tanifuji, M. Sokabe: "Sarcoplasmic Reticulum: Structure and Function", Y. Tonomura, S. Fleischer, ed., in press, Academic Press, New York (1983)
- 37) A. H. Caswell, J. D. Hutchison: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **42**, 43-49 (1971)
- 38) *idem: ibid.*, **43**, 625-630 (1971)
- 39) A. H. Caswell, S. Warren: *ibid.*, **46**, 1757-1763 (1972)
- 40) A. H. Caswell, B. C. Pressman: *ibid.*, **9**, 292-298 (1972)
- 41) R. L. Jilka, A. N. Martonosi, T. W. Tillack: *J. Biol. Chem.*, **250**, 7511-7524 (1975)
- 42) R. L. Jilka, A. N. Martonosi: *Biochim. Biophys. Acta*, **466**, 57-67 (1977)
- 43) K. Nagasaki, M. Kasai: *J. Biochem.*, **87**, 709-716 (1980)
- 44) 長崎一夫, 葛西道生: 日本生物物理学会第20回年回講演予稿集, p. 69, 大阪 (1982)
- 45) G. K. Radda, J. M. Vanderkooi: *Biochim. Biophys. Acta*, **265**, 509-549 (1972)
- 46) 葛西道生: 「生体膜実験法(上)」, 赤松穰他編, pp. 105-120, 共立出版 (1974)
- 47) A. S. Waggoner: *J. Membrane Biol.*, **27**, 317-334 (1976)
- 48) 葛西道生: 「Biophysical Chemistry(上)」, 今堀和友, 伊勢典夫共編, pp. 49-66, 化学同人 (1977)
- 49) L. Stryer: *J. Mol. Biol.*, **13**, 482-495 (1965)
- 50) J. M. Vanderkooi, A. N. Martonosi: *Arch. Biochem. Biophys.*, **133**, 153-163 (1969)
- 51) *idem: ibid.*, **144**, 87-98 (1971)
- 52) D. H. Haynes, H. Staerk: *J. Membrane Biol.*, **17**, 313-340 (1974)
- 53) D. H. Haynes: *ibid.*, 341-366 (1974)
- 54) D. H. Haynes, P. Simkowitz: *J. Membrane Biol.*, **33**, 63-108 (1977)
- 55) V. C. K. Chiu, D. Mouring, B. D. Watson, D. H. Haynes: *J. Membrane Biol.*, **56**, 121-132 (1980)
- 56) V. C. K. Chiu, D. H. Haynes: *ibid.*, 203-218 (1980)
- 57) D. H. Haynes: *Arch. Biochem. Biophys.*, **215**, 444-461 (1982)
- 58) A. S. Waggoner: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **8**, 47-68 (1979)
- 59) J. F. Hoffman, P. C. Laris: *J. Physiol.*, **239**, 519-552 (1974)
- 60) P. J. Sims, A. S. Waggoner, C. -H. Wang, J. F. Hoffman: *Biochem.*, **13**, 3315-3330 (1974)
- 61) T. J. Beeler, R. H. Farnen, A. N. Martonosi: *J. Membrane Biol.*, **62**, 113-137 (1981)
- 62) R. C. Young, R. Allen, G. Meissner: *Biochim. Biophys. Acta*, **640**, 409-418 (1981)
- 63) N. Bennet, Y. Dupont: *FEBS Lett.*, **128**, 269-274 (1981)
- 64) N. Yamamoto, M. Kasai: *Biochim. Biophys. Acta*, **692**, 89-96 (1982)
- 65) R. Coronado, C. Miller: *Nature*, **280**, 807-810 (1979)
- 66) G. Meissner, R. C. Young: *J. Biol. Chem.*, **255**, 6814-6819 (1980)
- 67) N. Yamamoto, M. Kasai: *J. Biochem.*, **89**, 1521-1531 (1981)
- 68) Z. I. Cabantchik, P. A. Knauf, A. Rothstein: *Biochim. Biophys. Acta*, **515**, 239-302 (1978)
- 69) A. J. Pesce, C. Rosen, T. L. Pasby: "Fluorescence Spectroscopy", p. 50, Marcel Dekker, New York (1971)
- 70) 吉原経太郎, 井上彰則: 「けい光現象」, 徳丸克己編, pp. 41-74, 共立出版 (1975)
- 71) V. O. Stern, M. Volmer: *Physik. Z.*, **20**, 183-188 (1919)
- 72) M. R. Eftink, C. A. Ghiron: *J. Phys. Chem.*, **80**, 486-493 (1976)
- 73) S. S. Lehrer, P. C. Leavis: *Methods Enzymol.*, **49**, 222-236 (1978)
- 74) T. Ando, H. Asai: *J. Biochem.*, **88**, 255-264 (1980)
- 75) *idem: ibid.*, 265-276 (1980)
- 76) H. -P. H. Moore, M. A. Raftery: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4509-4513 (1980)
- 77) W. C. -S. Wu, H. -P. H. Moore, M. A. Raftery: *ibid.*, **78**, 775-779 (1981)
- 78) 田口隆久, 葛西道生: 蛋白質核酸酵素, **26**, 1568-1577 (1981)
- 79) 布垣一幾, 葛西道生: 日本生物物理学会第20回年回講演予稿集, p. 70, 大阪 (1982)
- 80) 曾我部正博, 米谷忠篤, 谷藤 学, 葛西道生: 同上, p. 72, 大阪 (1982)
- 81) F. Conti: *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **4**, 287-310 (1975)
- 82) L. B. Cohen, B. M. Salzberg: *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **83**, 35-88 (1978)