

シリーズ「パッチクランプ実験技術法講座」

ホールセル記録法と穿孔パッチ法

八 尾 寛

(京都大学医学部生理学教室)

ホールセル記録法

Hamill らにより1981年に報告されたパッチ電極法の改良⁴⁹⁾は、画期的な内容を含んでおり、多くの生理学研究者の注目を集めた。すなわち、パッチ電極を細胞の表面に当ててシールさせた後、陰圧を加えることにより、電極直下の膜を破り、電極内の電解質液と細胞内液を交通させる。このホールセル記録法は、パッチ電極法がチャネルの生物物理学的研究のみならず、細胞生理学的研究にも応用できることを示唆していた。この論文で示された可能性の一つは、従来のガラス管微小電極法では困難であるとされていた小細胞の膜電位・膜電流の測定である。これにより、イオンチャネルが細胞においてどのように機能しているのかが明らかにされる。前稿で述べられた単一チャネル(ミクロ)記録は、マクロの電流記録と対応させることにより、はじめてその生理的意義が明らかにされる。第二に、細胞内液を人工的な溶液で灌流することが可能になった。細胞内灌流法は、カタツムリの神経節細胞などの巨大な細胞で、すでに試みられていたが、非常に高度の技術が必要とする研究法であった^{21), 70), 77), 127)}。see review²⁰⁾。細胞内液を実験的に操作することにより、細胞内情報伝達機序を解析することが可能になった。事実、Hamill らの論文から15年間にホールセル記録法を用いて細胞生理学的研究は飛躍的に進展した。多くの種類の細胞において、細胞機能と膜電位の間に密接な連関が認められている^{56), 98)}。ホールセルパッチ法の第三の可能性は、1982年 Neher と Marty の発表した細胞膜容量測定である⁹⁶⁾(丸山の稿参照)。これにより、エクソサイトーシス、エンドサイ

トーシスなどの重要な細胞機能を測定する道が開かれた。ホールセルパッチ法の応用は現在も拡大しつつある。ホールセル記録下にある細胞をバイオセンサーとして用いる試みは、この手法の工学的応用の可能性をはらんでいる。また、単一細胞の mRNA をホールセルパッチ法により採取する方法は、生体細胞の空間的・時間的多様性を解析し、多様性発現の機序を明らかにする道を開くものである。

(1) 基本的な実験手技

ホールセルパッチ法の実験手技に関しては、すでに他書に詳しい⁹⁰⁾。List 社や Axon 社から発行されているパッチクランプ増幅器のマニュアルには、基本的な原理から手法まで詳しく説明されている¹¹⁵⁾。本稿では、実用的な側面に限定してこれを簡潔に説明したい。

標本作成

パッチ電極法が開発された当初は、単離された細胞や培養細胞(継代培養ならびに初代培養)にその適用が限られていた。これは次の2つの理由に基づいている。(1) パッチ電極を細胞表面に当てる際に顕微鏡下に細胞および電極先端を直視する必要がある。(2) 通常の組織においては細胞間隙にコラーゲン繊維などの結合組織が存在している。このような結合組織を除去しなければ、パッチ電極と細胞膜の間に抵抗の大きなシールを形成することができない。逆にいえばこの2条件を満たしてさえいれば、いかなる標本にもパッチ電極法が適用できる。このため、組織のスライス標本³⁴⁾(高橋・真鍋の稿参照)や自律神経節細胞¹³⁴⁾など細胞構築を維持した状態でパッチ電極法が適用されるようになった。

た. 場合によっては条件(1)は不可欠ではない. 脳の海馬などの様に同質の細胞がクラスターを形成している組織においては, 電極抵抗をモニターしながら組織内に電極を挿入し, 抵抗の高いシールを形成することができる. その際, 個々の細胞を直視する必要がない(ブラインドパッチ法, 高橋・真鍋の稿参照)^{13), 24), 87)}. すなわち, 工夫次第でほとんどあらゆる細胞, 組織に対しパッチ電極法が適用できるだろう. たとえば, 自律神経節の細胞に対しては, 生きた動物の *in situ* 標本に対してもパッチ電極法を適用することが不可能ではない^{104), 105)} が, 必要がないので試みられていないだけである.

顕微鏡

どのような顕微鏡を用いるかは, 標本による. ブラインドパッチ法の場合は解剖用実体顕微鏡が最適である. 単層の細胞標本に対しては, 位相差顕微鏡が使用できる. ノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いれば細胞表面を明瞭に観察することができる. スライス標本には通常, 正立型ノマルスキー微分干渉顕微鏡が用いられる. 自律神経節に対しては, 斜光照明や反射照明を利用すれば, 普通の正立型顕微鏡下に個々の細胞を同定することができる^{104), 134)}. 数層の組織からなる標本には, 正立型の顕微鏡を用いるのが合理的である. これは, パッチ電極を近づける細胞が, その組織の最上層の細胞であることが多いからである. 赤外線テレビカメラを装着した顕微鏡の場合には, 厚い組織の内部の構造を捉え, これにパッチ電極を当てることができる¹²¹⁾.

電気生理学的手法の一般的注意として, 電源に由来するハムノイズを除去しなければならない. これには, 顕微鏡本体をアースするのが最も有効である. ハムがランプに由来しているときは, 測定時にランプを消すのが最も簡単な方法である. ランプの電源を直流にするのも良い方法である. この際, 高価な直流安定化電源は必ずしも必要ではない. 直流のプラス極かマイナス極のどちらか一方をアースすることによ

り, 直流に混入するハムをのぞくことができる. 正立型顕微鏡で水浸対物レンズを使用するとき, これが絶縁されていないとハム発生源になることがある. 著者らのラボでは, 水浸対物レンズと顕微鏡本体の間に絶縁器具を装着している.

電極作成

ホールセル記録に用いる電極は, 単一チャネル測定の場合とほぼ同様である. しかし, ホールセル記録の場合, 測定電流が単一チャネル電流に比べ, 一般に大きい. また, 測定対象となる膜の面積が大きくなるので, これに由来するノイズレベルが高くなる. このため, パッチ電極と溶液の間の浮遊容量(stray capacitance)由来のノイズが比較的問題にならないことが多い. このため, 肉厚の薄い電極を用いても, 場合により, 先端までシルガードコーティングをする必要がない. ただし, ある程度浮遊容量を小さくしておかないと後述の容量補正が効かない. 著者は, 肉厚の薄い電極の先端約 1 mm を残して溶液と接する部分をシルガードコーティングしたものを用いている. しかし, 測定対象になる電流が微小なときは単一チャネル記録と同様の注意が必要になろう. 要は, 常に S/N 比を考慮にいれて最適の条件で実験することである.

図 1 A, B はホールセル記録の等価回路を示したものである. 電位固定に際して, フィードバックが有効なのは, パッチ電極内液までである(図 1 A). 電極内の電位を V_p , 細胞内電位を V_c とすると, 定常状態において,

$$V_c = \frac{R_m V_p - R_s E_m}{R_m - R_s} \quad (1)$$

の関係が成り立つ. ここで E_m , R_m は, 細胞の静止膜電位ならびに細胞の膜抵抗, R_s は電極と細胞の間のアクセス抵抗である. 膜の比抵抗が一定であるとする R_m は細胞の表面積に反比例する. すなわち, 小細胞の膜電位は制御し易いが, 大きな細胞の膜電位を制御するためには R_s が大きすぎてはならない. また, 膜電

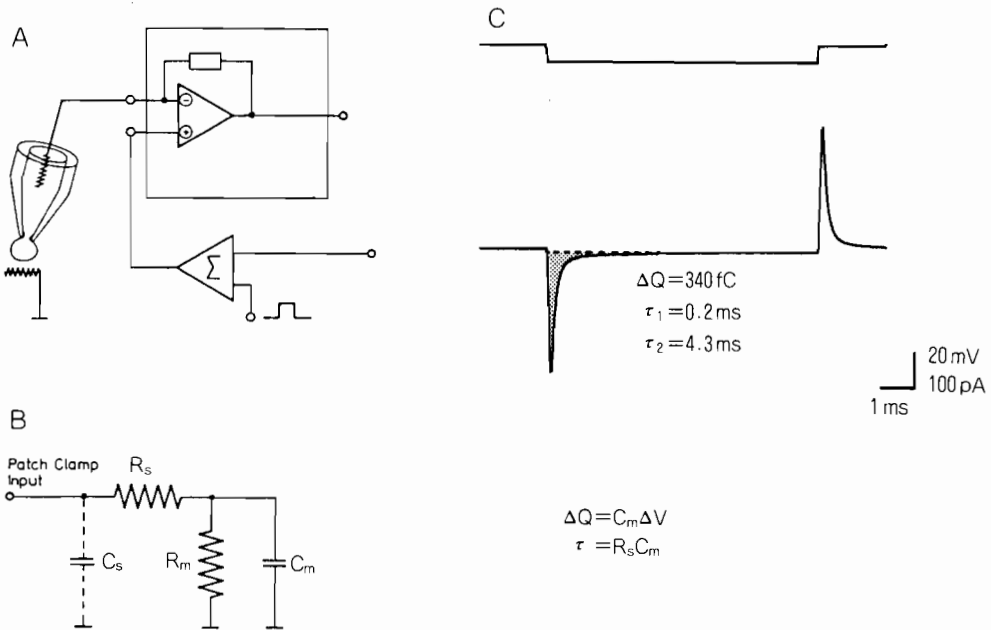


図1. ホールセルパッチ測定法

A. 測定装置の概要. B. ホールセルパッチ状態の等価回路. R_s : パッチ電極のアクセス抵抗, R_m : 細胞膜抵抗, C_m : 細胞膜容量, C_s : 浮遊容量. C. 過分極パルス通電(上段, 大きさ $\Delta V = 10 \text{ mV}$)に応答するホールセル容量性電流(下段). 保持電位 -60 mV . ハッチの面積 ΔQ より, 細胞の全膜容量 $C_m = 34 \text{ pF}$ が算出される. 本例では, 容量性電流の下降相は2つの指数関数の和で最適回復した. 2コンパートメントモデル⁸³⁾に基づいて, それぞれの時定数 $\tau_1 = 0.2 \text{ ms}$, $\tau_2 = 4.3 \text{ ms}$ から, $C_1 = 16 \text{ pF}$, $C_2 = 14 \text{ pF}$ が得られる. R_s はアクセス抵抗で, この時 $13 \text{ M}\Omega$. (AおよびB, 文献96より加筆変更)

位を変化させると膜の比抵抗も変化する. たとえば, 膜電位が0付近から正電位になると K^+ チャネルなどのイオンチャネルが活性化され比抵抗が減少する. この時, 膜電位を制御するためには R_s が充分小さくなければならない. 電位固定実験において, 測定電流が大きいときは, 膜電位の制御が行われているかを再検討することが望ましい⁸⁾.

アクセス抵抗 R_s は, おもにパッチ電極の形状に依存している. 電極の先端部が円錐であると仮定するとパッチ電極抵抗 R_p は次の式で表される.

$$R_p = \frac{\rho l}{\pi r_s^2} + \frac{\rho \cot(\phi/2)}{\pi} \left(\frac{1}{r_t} - \frac{1}{r_s} \right) \quad (2)$$

ここで r_s , r_t は, それぞれ, ガラス管の基部(長さ l) および先端の内径を, ϕ は先端角の大き

さである. ρ は, 内液の比抵抗で, 150 mM KCl (at 25°C) の場合 $51 \text{ }\Omega\text{cm}$ である. すなわち, 先端径の大きいほど, また, 先端角の大きいほど R_p が小さくなる. 一般に R_s はパッチ電極抵抗 R_p の2~5倍になる. これは, ホールセル状態においては, 電極の先端部に細胞膜, 細胞内構造物などが進入しているためである.

電極先端のポリッシングは, 高抵抗シールを形成するのに必ずしも必要ではない. しかし, 著者の経験では, ポリッシングを少しでも行った法が, ホールセル状態を長時間維持し易い傾向がある. ポリッシングをしない電極では, ホールセル測定中に膜のリーク電流が徐々に大きくなり, ついには膜電位が制御不能になることが多い.

電極内液

電極内液は、実験の目的に応じて様々なものを用いることができる。電極内液の基本的な出発点は、等張の KCl 液である。細胞内の生理的条件では、pH は、7 付近、 Ca^{2+} 濃度は、約 10~100 nM (pCa 7~8) である。HEPES などの pH バッファ、EGTA などの Ca^{2+} キレートによりこれを調節する(表 1)。また、細胞内の陰イオンにおいて、膜非透過性のものの占める割合は大きい。この意味において、 Cl^- を非透過性の陰イオン、 SO_4^{2-} 、methansulfonate、gluconate、glutamate、aspartate で置換した内液の方がより生理的状态に近い。これらの陰イオンを用いると、KCl 溶液に比べ liquid junctional potential が大きくなる。Liquid junctional potential の補正については他書を参照されたい^{38), 94)}。また、有機の酸が陰イオンの時は、pH や温度に解離状態が依存しているため、浸透圧が問題になるときは、これを実際に測定して補正することが望ましい。微生物が繁殖し易いことにも留意すべきである。具体的には、小分けして-20℃に冷凍保存するのがよい。反対に、陽イオンを膜非透過性の有機塩基、tetraethylammonium、N-methyl-D-glucamine などに置換することもしばしば行われる。有機塩基を用いることにより、イオンチャネルの膜電位依存性が負電位側にシフトする可能性を考慮にいれる必要がある⁸⁶⁾。これは、形質膜細胞質側の表面電位が変化することがその一因であると考えられる。

Ca^{2+} 依存性のイオンチャネル電流を測定したり、開口分泌などの細胞内 Ca^{2+} により制御される細胞機能を取り扱うとき、また、細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定を試みる場合は、 Ca^{2+} キレートの濃度を低くする必要がある。 Ca^{2+} キレートの濃度が高いと遊離 Ca^{2+} 濃度が低い値に固定されるため Ca^{2+} に依存した現象が充分認められない。表 1 に細胞内 Ca^{2+} 測定に用いられる溶液組成を一例として挙げた。反対に、 Ca^{2+} 依存性の現象、たとえば Ca^{2+} チャネルの Ca^{2+} 依存性不活性化などをできる限り除去する必要がある場合がある。このような場合は、EGTA の代わりに BAPTA などの Ca^{2+} 結合速度の速いキレートが用いられる。表 1 に Ca^{2+} 電流測定に用いられる溶液組成を挙げた。この溶液では、 K^+ を Cs^+ で置換している。これは、細胞内の Cs^+ により K^+ チャネルをブロックし、 Ca^{2+} 電流を単離して測定することを目的としている。

ホールセル記録の問題点の一つに細胞機能の rundown がある。これは、細胞内液が電極内液に置換されるため、細胞機能の維持に必要な可溶性成分が失われる (washout) ためである。既知のものは電極内液に適量補うことにより rundown を防ぐことが試みられている。たとえば、 Ca^{2+} 電流の rundown は、電極内液に ATP を補うことによりその速度を減少させることができる。これは、 Ca^{2+} チャネルにはリン酸化部位があり、リン酸化されていることが機能維持に必要であることにより説明される。

表 1. ホールセル電極内液の組成 (単位, mM)

基 本 組 成	KCl 140, MgCl ₂ 1, CaCl ₂ 1, EGTA 10, Mg-ATP 2, NaOH-HEPES 10, pH 7.3	文献34
Ca^{2+} 測 光 用	Cs-glutamate 125, TEA-glutamate 20, MgSO ₄ 2, K ₅ fura-2 0.1, Na ₄ ATP 2, HEPES 10, pH 7.0	文献129
Ca^{2+} 電流測定用	CsCl 140, NaOH 10, MgCl ₂ 1, BAPTA 5, Mg-ATP 5, GTP 0.3, CsOH-HEPES 20, pH 7.4	文献136
ATP-regenerating system	creatine phosphokinase 50U/ml, Na ₂ creatine-phosphate 20, Mg-ATP 5, GTP 0.04 を適当な内液に追加する。	文献40

ATP 濃度が減少すると脱リン酸化の方に平衡がシフトする。しかし、ATP を補うだけでは、チャネル近傍の ADP 濃度が結果的に上昇し、これも脱リン酸化を促進する。これを防ぐには ATP-regenerating system が用いられる⁴⁰⁾ (表 1)。受容体の情報伝達に G タンパク質が関与している系がある。このような受容体の機能を維持するためには電極内液に 0.1~0.3 mM の GTP を補う必要がある。

細胞内情報伝達系を解析する目的で、様々な内因性ならびに外因性の物質を電極内液に存在させることが試みられている。たとえば、A-キナーゼ、C-キナーゼやプロテアーゼなどの酵素、フォスファターゼインヒビターやカルモジュリンなどの細胞内因子、cAMP や IP₃ などの二次メッセンジャー、あるいは、これらを抑制する薬物、選択的毒素を細胞内に投与することができる。このような薬物の中には、それ自身は活性を持たないが強い光を当てて分解されることにより生理活性を示すケージ化合物と呼ばれる一群のものがある(野間の稿参照)。細胞機能に関与すると予想される因子に対する抗体や競合性ペプチドフラグメントを細胞内に導入することにより、機能を担っている分子を同定することが試みられている。また、Ca²⁺ 感受性色素、pH 感受性色素などを導入することにより細胞の機能を、Lucifer yellow などの蛍光色素を導入することにより細胞の形態を研究することができる。ホールセル状態を維持しながら電極内液を置き換えることができる(細胞内灌流法)。これにより、細胞内因子の定性的ならびに定量的解析が可能になる。細胞内灌流法については堀江の稿で詳述する。

ホールセル作成ならびに測定法

通常パッチ電極に陽圧を加えながら電極の先端を細胞表面に近づける。この時、0 mV に電位固定して、1 mV、10~20 ms の脱分極あるいは過分極パルスを連続的に加え、そのときの電流をモニターする。電極が細胞表面に到達するとパルスに応答する電流が減少することが認

められる。ここで、電極内圧を陽圧から弱い陰圧に切り替えることにより、さらに電流が減少する。すなわち、電極と細胞膜の間に抵抗の高いシールが形成される。固定電位を負電位側に移動させることによりシールの形成が促進される。細胞の静止膜電位近傍に固定電位を合わせたときに流れる電流がほぼ 0 になれば、パルス幅を大きく(たとえば 10 mV)し、電流測定のゲインを上げて、シール抵抗を測定する。いわゆるタイトシールが形成されるとシール抵抗の大きさは 10 G Ω 以上になる(gigaseal)。すなわち、10 mV のステップパルスに応答して、1 pA 以下の電流が流れる。この時、単一チャネル電流が認められることがあり、これが単に電極が詰まっただけなのか、きれいなタイトシールが形成されたかを判断する良い指標になる。パルスの立ち上がりとしち下がりに同期して、一過性の電流が認められる。これは、浮遊容量性電流である。これを補正して、ほぼ 0 にする。

次いで、電極内に大きな陰圧を与えてパッチ下膜を破壊する。あるいは、持続の短い大きなパルス(例えば、大きさ $\pm 0.5 \sim 5$ V、持続時間 2~20 ms)を単発与えることによりパッチ下膜を破壊する方法(Zap 法)がある。パッチ下膜が破壊されると同時に、10 mV のステップパルスの立ち上がりとしち下がりに大きな一過性の電流が生じる(図 1 C)。これは、細胞膜に由来する容量性電流である。この容量性電流を解析することにより、細胞の膜容量 C_m 、膜抵抗 R_m 、電極と細胞のアクセス抵抗 R_s などを求めることができる(図 1 C)。容量性電流を補正して、これをできる限り小さくする。等価回路が図 1 B のモデルで表されるときは、容量性電流を原理的に 0 にすることができる。また、この時の補正值からも、 C_m と R_s を求めることができる。しかし、このような場合は実際には希で、ほぼ球形の小細胞に限られる。神経細胞のように突起を有する細胞では、細胞質の抵抗が問題になり、補正が効くのは、パッチ電極の近傍に限られる。この時の補正值は、すなわち、有効な電位固定が行われる領域の膜容量を示してい

る。このような細胞の C_m , R_m , R_s などは、細胞と電気的に等価なモデルに基づく式を当てはめることにより求められる^{(64), (65), (83), (85)}。

ホールセル記録には、電流固定モードと電位固定モードがある。前者においては、一定あるいは実験的に変化させた電流を与えて、それに応答する膜電位を測定することができる。たとえば、電流 0 に固定したときは、細胞の自然な応答(静止膜電位、自発性膜電位振動、自発性活動電位など)を測定することができる。電位固定で解析したイオン電流が膜電位の形成にどのように寄与しているかを明らかにする上で電流固定実験は重要である。

電位固定実験においては、測定しようとする電流の大きさおよび変化の速さが問題になる。膜を横切って電流が流れるときに膜電位を一定に保つためには、測定システムのフィードバックが充分速くなければならない。たとえば神経細胞においては、脱分極電位に応答して速い時間経過のナトリウム電流が流れるが、フィードバック速度が遅いと正電荷が細胞内に蓄積し、さらに膜電位が脱分極側にシフトする。この結果さらに大きなナトリウム電流が流れ、神経細胞は活動電位を発生する。測定システムのフィードバックの速さは次式で与えられる。

$$\tau = [R_s' R_m / (R_s' + R_m)] C_m \quad (3)$$

ただし、 $R_s' = R_s (1 - f)$ (f はフィードバック補正值)である。一般に $R_m \gg R_s'$ のので、 τ はほぼ $R_s' C_m$ に等しい。すなわち、アクセス抵抗が小さいほど、また、細胞の表面積が小さいほど、電位固定が成立し易い。また、電流の大きさを減少させることにより、良い電位固定が得られる。例えば、 Na^+ 電流の場合は、外液の Na^+ 濃度を下げたり、テトロドトキシン(TTX)で活動性チャネルの数を減少させることにより、膜電位の変化を補正することが可能になる。

ホールセル記録法の応用

(1) イオンチャネルのマクロの性質の解析

一般に、個々のイオンチャネルは閉状態と開状態を二者択一的にとる。この状態の移行はき

わめて速やか(μ 秒オーダー)であり、その中間状態(subconductance state)は、まれに認められるにすぎない。イオンチャネルによっては、複数の開レベルを示すものも知られている^{(16), (30), (50), (51), (66), (117), (128)}。この意味で、イオンチャネルの性質は時間的、空間的に確率的である。すなわち、ある一定時間において、一個のチャネルが開状態にある時間、およびある時刻において、ある種のイオンチャネルの集合のうち開状態にあるものの個数が、そのイオンチャネルを通るイオンの量(すなわち電流)を決定する。このうち後者は、単一チャネルの活動性から直接知ることができず、ホールセル電位固定下にマクロの電流を測定することが有力な手段となる。個々のチャネルが独立に確率的に開閉する(マルコフ過程)と仮定すると、ある一定時間中にチャネルが開状態にある時間の占める割合(開確率 p , ミクロ)と、細胞全体の機能的なチャネル N 個のうち、ある時刻のまわりの微小時間において開状態にあるチャネルの占める割合(マクロ)が等しくなる。すなわち、単一チャネル電流 i とホールセル電流 I の間に次の関係が成立する。

$$I = Npi \quad (4)$$

チャネル活動性の膜電位依存性の解析

チャネルの状態を規定する重要な因子の一つは膜電位である。イオンチャネルの多くは膜電位依存性を示すことが知られている。図2は、いろいろなイオンチャネルのホールセル電流の膜電位依存性を示したもので、膜電位を横軸に、電流の大きさを縦軸にとっている(電流-電位曲線、 $I-V$ プロット)。電流が0になるときの膜電位は、反転電位あるいは0電流電位と呼ばれ、チャネルのイオン選択性およびチャネルの両側のイオン濃度に依存している。たとえば、グルタミン酸AMPA受容体チャネルの反転電位は、図2Aでは約0mVだが、細胞外の Na^+ 濃度に依存しており、その関係はほぼNernst式に従う。反対に細胞内の K^+ 濃度に対してもNernst式に従った関係を示す。しかし、陰

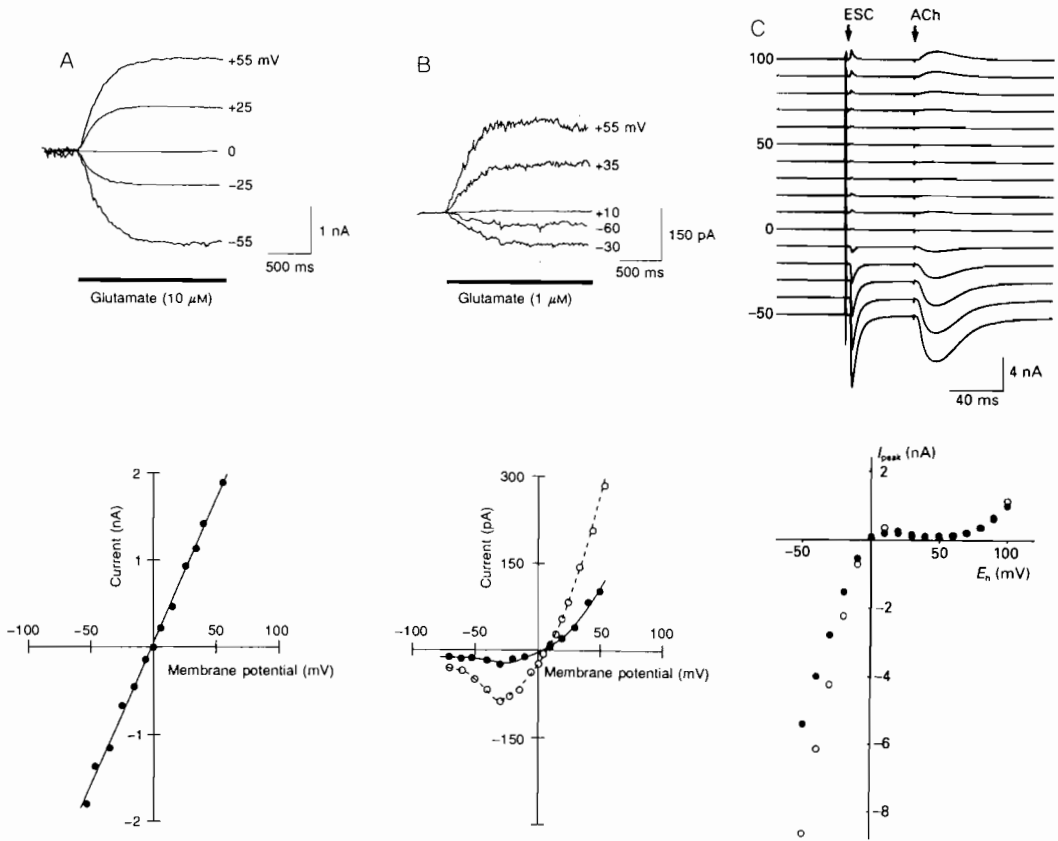


図2. 受容体チャネルホールセル電流の膜電位依存性

各図とも上段は電流のサンプル記録を、下段はピーク応答の電流-電位曲線を示している。A. ラット小脳プルキニエ細胞のグルタミン酸 AMPA 受容体応答。B. ラット小脳顆粒細胞のグルタミン酸 NMDA 受容体電流の外向き整流応答。●, ○は、それぞれ、0.5 および 1 μM のグルタミン酸に対する応答を示している。C. マウス顎下神経節ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体の内向き整流応答。○は節前線維刺激による興奮性シナプス電流 (EPSC) を、●はアセチルコリンのイオン泳動的投与 (ACh) に対する応答を表している。(AおよびB, 文献68; C, 文献134)

イオンの濃度を変えても反転電位に変化が認められない。このような実験から AMPA 受容体チャネルは、アルカリカチオン選択的であるが、カチオン間の選択性が緩やかなチャネル (非選択のカチオンチャネル) であることが知られた。

図2 Bに示したグルタミン酸 NMDA 受容体チャネルも非選択のカチオンチャネルであるが、 Ca^{2+} に対する透過性が高いことが知られている。このチャネルの電流-電圧関係は、AMPA 受容体チャネルと異なり、直線的なオームの法則から大きくずれている。マイナス電流

(細胞からみると細胞外から細胞内へ向かう電流、すなわち内向き電流) が -50 mV よりも負の電位 (過分極電位) で著明に抑制される。このような外向き整流特性が NMDA 受容体チャネルの特徴である。これとは反対に自律神経節細胞のニコチン性アセチルコリン受容体チャネル電流は、プラス電流 (外向き電流) が抑制される内向き整流特性を示す (図2 C)。

Na^+ チャネル、 K^+ チャネル、 Ca^{2+} チャネルなどのように膜電位そのものがチャネルの開閉を決定しているものでは、ステップ状のバル

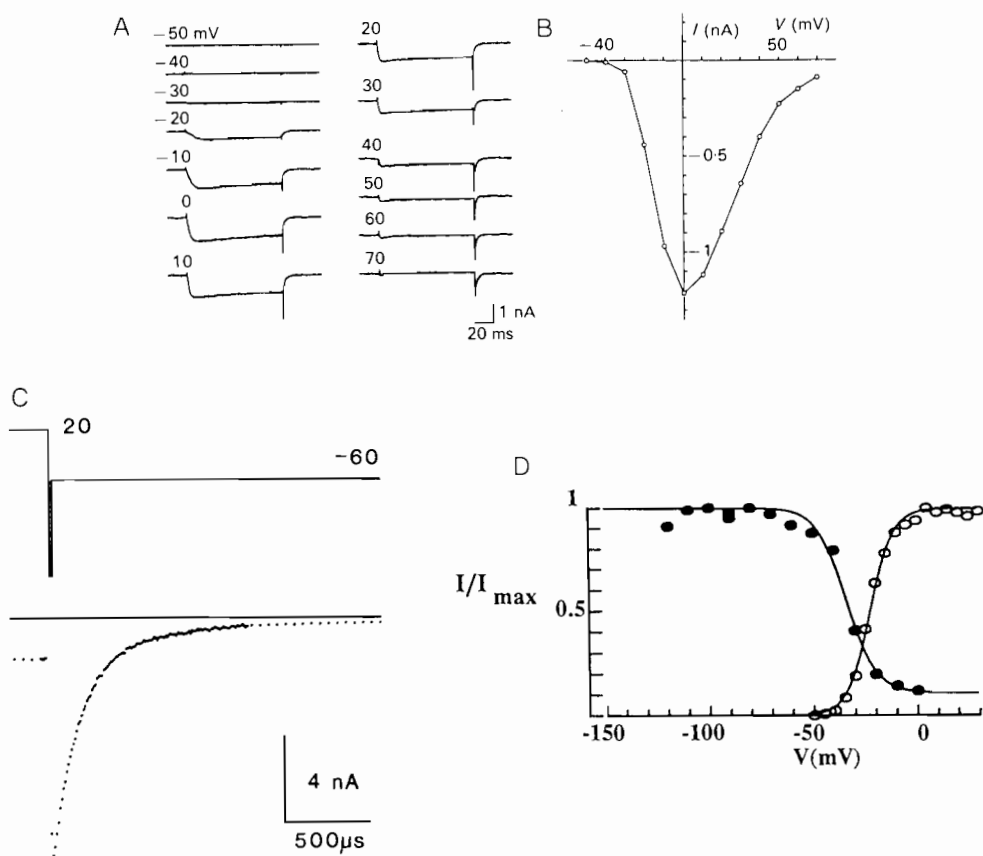


図3. Ca^{2+} チャネル活動性の膜電位依存性

A. チック毛様体神経節杯状シナプス前終末の高電位活性化型 Ca^{2+} 電流のサンプル記録。保持電位 -80 mV , 100 ms 脱分極パルスに対する応答。B. 同標本の Ca^{2+} 電流のピーク値の電流-電位曲線。C. チック後根神経節ニューロンの Ca^{2+} テール電流。保持電位 -80 mV , $+20 \text{ mV}$, 10 ms パルスの後 -60 mV に再分極させる(上段)。再分極に先行して -240 mV のパルスを $15 \mu\text{s}$ 与えることにより、細胞膜の放充電を促進し、容量性電流を最小にしている(supercharging 法)¹¹⁵⁾。下段は、 Ca^{2+} 電流応答を示している。D. ラット小脳プルキニエ細胞の高電位活性化型 Ca^{2+} 電流の活性化($\circ$)および不活性化($\bullet$)の膜電位依存性。保持電位 -80 mV , テール電流の大きさを再分極後 0.3 ms から 0.4 ms の平均として求めた値を最大値に対する相対値としてプロットすることにより、活性化の膜電位依存性を求めた。不活性化の膜電位依存性は、保持電位 -90 mV から2秒間のプレパルスを与えた後、 -20 mV , 12 ms パルスに対するピーク値を測定した。プレパルスの大きさを変化させ、最大電流値に対する相対値をプロットしている。実線はともに Boltzmann 関係に最適回帰した結果を示している(本文参照)。(AおよびB, 文献136; C, 文献123; D, 文献109)

スを用いて膜電位依存性が調べられることが多い。図3 Aは Ca^{2+} チャネルホールセル電流の膜電位依存性を検討したものである。図3 Bはその電流-電位関係を示している。

テール電流の解析

電位依存性のチャネルにおいては、膜電位のステップ状の変化にともなって過渡的な電流(テール電流, tail current)が見られる。図3 Cは Ca^{2+} チャネル電流のテール電流の一例を示したものである。たとえば -80 mV の保持電

位から +20 mV にステップ状に電位を変化させたとき、ホールセル電流は、ほとんど流れない。これは、 Ca^{2+} チャンネルの反転電位に近いために駆動電圧が小さいことに起因している。しかし、-60 mV に膜電位を変化させると一過性に大きな電流が流れるのが認められる。これは、駆動電圧が大きくなったために個々のチャンネルを大きな電流が流れたことによる。しかし、チャンネルそれぞれは、時間とともに確率的に閉じていく。チャンネルが n 個の開状態と 1 つの開状態しか有しないと仮定する。すなわち、

$$C_n \frac{\beta_n}{\alpha_n} \rightleftharpoons C_2 \frac{\beta_2}{\alpha_2} C_1 \frac{\beta_1}{\alpha_1} O \quad (5)$$

ここで開速度常数 $\alpha_1 \sim \alpha_n$ 、閉速度常数 $\beta_1 \sim \beta_n$ は膜電位の関数である。時刻 $t=0$ に膜電位を -20 mV から -60 mV にステップ状に変化させたとすると、-60 mV においては Ca^{2+} チャンネルは活性化されないで、一度閉じたチャンネルは再び開かない。すなわち $\beta_1 \ll 1$ なので、チャンネルの開確率 $p(t)$ は、次の指数関数に従って減衰する。

$$p(t) = p(0) e^{-t/\tau} \quad (6)$$

$$\tau = \frac{1}{\alpha_1} \quad (7)$$

ホールセル電流は、個々のチャンネルを流れる電流の総和なので、テール電流の大きさは、指数関数に従って減衰することが予想される(図5参照)。 Ca^{2+} チャンネルの場合、テール電流の減衰はほぼ指数関数に従い¹²²⁾、その時定数の逆数から -60 mV の時の平均の開速度常数を求めることができる。

図3Dは、ステップ電位の大きさを変えたときのテール電流の大きさをプロットしたものである。この時、単一チャンネル電流の大きさが固定されているので、この関係は、チャンネル開確率の膜電位依存性を表している。あてはめた曲線は Boltzmann の関係から求めたものである。すなわち、

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \exp \frac{(V_h - V)}{\beta}} \quad (8)$$

ここで、 V_h は、チャンネルの半分が活性化される電位を、 β は傾斜因子と呼ばれる。チャンネル分子の構造の変化にともなって、膜の内外に電荷の移動が生ずる。 β と移動電荷の間には次の関係がある⁵⁵⁾。

$$Z = \frac{kT}{e\beta} \doteq \frac{24}{\beta} \quad (9)$$

(k: Boltzmann 定数, T: 絶対温度)

図3Dに示した Ca^{2+} チャンネルにおいては、 V_h は -22 mV、 β は 5.8 mV で、13個の平均値から移動電荷の数は3個と推定される。

チャンネルの不活性化

電位依存性チャンネルには、膜電位に依存して不活性化するものが知られている。図4Aは、N型 Ca^{2+} チャンネルの単一チャンネルレベルでの不活性化を見たものである。個々のチャンネル活動は確率的に振る舞うのでこれを加算平均することによりその時間依存性が明らかになる(アンサンブル平均、図4B)。これに対してホールセル電流はチャンネル活動の空間平均を表している。アンサンブルとホールセル電流の時間依存性はほぼ一致している(図4B)。このことは、個々のチャンネルが独立に確率的に開閉するという考えと矛盾しない。

チャンネルの不活性化の速度は一般に膜電位に依存している。また、定常状態における不活性化の程度も膜電位に依存している。電流を測定しようとするパルスに先行する保持電位を変えることにより、定常状態における不活性化の膜電位依存性を Ca^{2+} チャンネルについて調べたものを図3Dに示す。不活性化を示さない電流成分を I_c とすると、この関係は次の Boltzmann 式に従う。

$$I = \frac{I_{\max}}{1 + \exp \frac{V - V_h}{\beta}} + I_c \quad (10)$$

この例では、 V_h は -34 mV、 β は 6.9 mV で、8個の平均値から得られた移動電荷数は2と推定される。

チャンネルの活性化・不活性化にともなう電荷

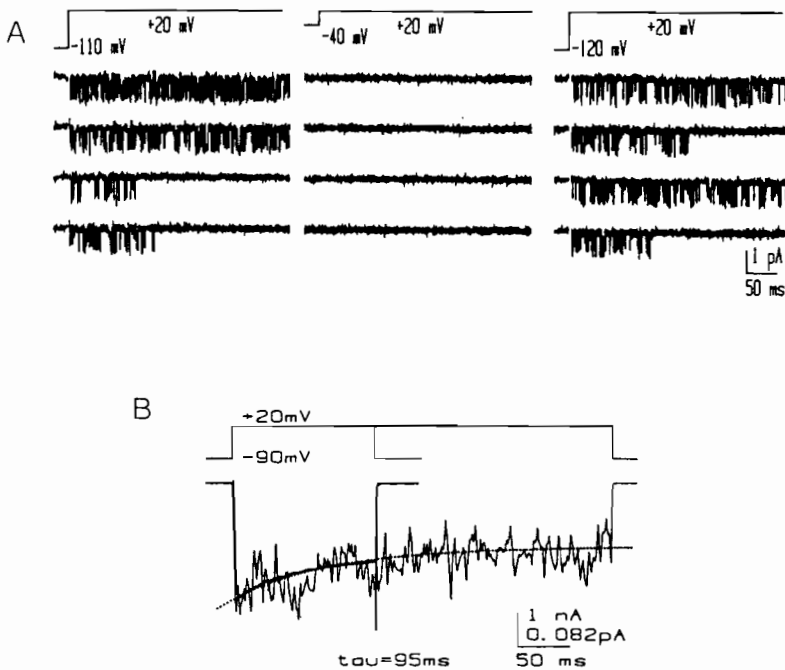


図4. Ca^{2+} チャンネルの不活性化(文献103)

A. N型 Ca^{2+} チャンネルの単一チャンネル記録. 最上段はそれぞれ電位コマンドプロトコルを示している. 左上段の2つのトレースでは, 脱分極中のチャンネルの活動性に変化が認められないが, 左下2段のトレースでは, 脱分極直後にしかチャンネルの開状態が認められない. この様な2~3種類のモードを行き来するのがN型 Ca^{2+} チャンネルの特徴である^{31), 102)}. 脱分極電位に保持するとチャンネルの開状態がほとんど認められない. B. N型 Ca^{2+} チャンネルの単一チャンネル活動35トレースのアンサンブル平均とホールセル電流. 点線は, ホールセル電流を指数関数と定数項に最適回帰した結果を示している.

の移動は, ホールセル記録下で微小な電流として記録される(ゲート電流, 文献6を参照). 活性化にともなうゲート電流はイオン電流に先行して認められる. ゲート電流を単独に取り出すには, イオン電流をチャンネルブロッカーで抑制するか透過性のイオンを除去した状態で電位固定をする. 直線性のイオン電流成分および容量電流成分を差し引くことにより, 非対称的な容量電流成分として, ゲート電流が取り出される. ホールセルパッチ法によるゲート電流の解析は, 心筋細胞の Ca^{2+} チャンネル³⁸⁾ において報告されている. 骨格筋培養細胞の興奮-収縮連関において, ゲート電流と同様の電荷の移動が観察される. この電荷の移動は, T管に存在するジヒドロピリジン受容体の構造変化に由来していることが示された¹⁾.

(2) イオンチャンネルのミクロの性質の解析 シナプス電流の解析

ホールセル電流を解析することにより, イオンチャンネルのミクロの性質を解析することが可能である. 前述したテール電流の解析はその一例だが, アセチルコリンチャンネルなどの伝達物質によりゲートされるチャンネルにおいては, シナプス電流を解析することによりチャンネル開閉の動特性を知ることが可能である.

図5に示すように, 伝達物質が開口放出された時点においてのアセチルコリン濃度はきわめて高いので, 多くのチャンネルがほぼ同期して開く. しかし, アセチルコリンは速やかにチャンネル近傍から消失するので, 一度閉じたチャンネルは再び開かない. チャンネルが閉状態と1つの開状態しか有しないと仮定すると, 個々のチャネ

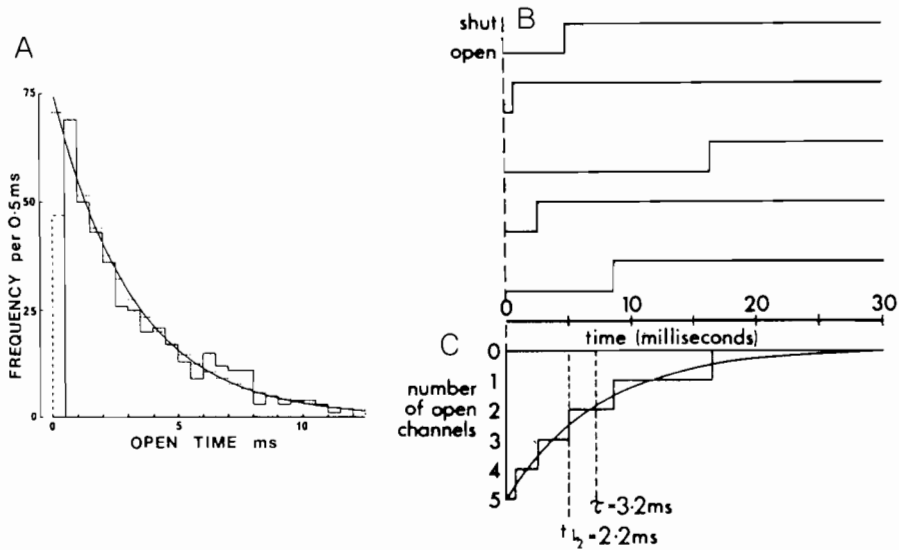


図5. シナプス電流下降相と単一チャンネルの平均開時間の関係(文献27)

A. カエル骨格筋終盤のアセチルコリンチャンネルの開時間ヒストグラム。実線は、最尤法から求めた指数関数分布である。B. シナプス間隙に放出されたアセチルコリンはきわめて速やかに消失するので、開口したチャンネルは、一度閉じると再び開かない。それぞれのチャンネルが開いている時間は、確率的に振る舞う。C. これらのアンサンブル平均がホールセル電流として測定される。すなわち、シナプス電流の下降相は指数関数に従う。

ルが開き続ける時間は、指数関数に従って分布する。ホールセル電流は、個々のチャンネルを流れる電流の総和なので、電流の大きさは、指数関数に従って減衰する。骨格筋の終板やカエルの交感神経節においては、シナプス電流の下降相はほぼ指数関数に従う^{72), 82), 84)}。この時の時定数は、アセチルコリンチャンネルの平均開時間に相当する。しばしば、シナプス電流の下降相は複数の指数関数によく当てはまることがある。このようなチャンネルはバースト状の活動を示し、チャンネルブロックなどの複雑な動特性が想定される。時定数の大きい方は平均バースト時間に、小さい方はバースト中における平均開時間にそれぞれ等しい²⁷⁾。

リガンド存在下に膜電位をステップ状に変化させると、テール電流のような過渡的な電流が認められる。骨格筋のアセチルコリンチャンネルでは、この過渡性電流は指数関数に従い、その時定数は、その膜電位における平均開時間に等しい(voltage-jump analysis^{2), 3), 10), 25), 97)})。自

律神経節のアセチルコリンチャンネルの場合、膜電位のステップ状の変化にともなう過渡性電流は、複数の指数関数によく当てはまる¹⁰⁶⁾。このことから、チャンネルがバースト状の活動を示すことがわかる。また、時定数の内、大きい方は平均バースト時間に、小さい方はバースト中における平均開時間にそれぞれ等しい。

単一チャンネル活動の測定

小細胞のホールセル記録においては、細胞の膜容量が小さいため、バックグラウンドノイズが非常に小さい。このような条件が満たされたとき、単一チャンネルのステップ状の活動が拾えることがある^{38), 49), 128)}。

ホールセルノイズ解析

ある時点において開状態にあるチャンネルの個数は確率的に変動するため、ホールセル電流は、ある平均値の周りで振動することが観察される。個々のチャンネルの活動が開と閉の2相しか

なく、かつ、開から閉、閉から開への移行がともに瞬時的であるという仮定のもとに、ホールセル電流の振動(ノイズ)を解析することにより、単一チャネルの性質を知ることができる^{5), 25), 26), 60)}。ノイズ解析法の詳細は、大森の稿を参照されたい。本稿では、自律神経節細胞のアセチルコリン受容体チャネル¹³⁴⁾を例にして、その方法の概略を説明する。

図6 Aは、自律神経節細胞のホールセル電流のアセチルコリンに対する応答を示したもので、保持電位を +20 mV から -20 mV に 10 mV 間隔に変化させている。アセチルコリン存在下に膜電流の変動の大きさが増大していることが認められる。このノイズ記録から変動の大きさと周波数成分の2つの情報が得られる。前者からは、単一チャネルを流れる電流の大きさが、後者からは、チャネル開閉の動特性に関するパラメータが抽出される。ノイズを解析するためには、図6 Aの様な直流記録と平行して、ローパスフィルタとハイパスフィルタを通した記録をとる。フィルタは減衰傾度の大きなバターワース関数(最大平坦)型が用いられる。各フィルタの遮断周波数は、解析しようとするチャネルの周波数成分により試行錯誤的に決定する必要がある。後述するチャネルの特性周波数(corner frequency)の10倍と 1/10 が目安になる。デジタル化するときの折り畳み現象(エイリアシング)を防ぐためにローパスフィルタの遮断周波数の約2倍がサンプリング周波数として適当である。連続記録されたデータを区切って高速フーリエ変換する。区切りの長さは、解析の上限の周波数の逆数が用いられる²⁵⁾。区切りごとのパワースペクトルを加算平均し、ベースラインノイズのパワースペクトルを差し引くことにより、アセチルコリン受容体チャネルノイズのパワースペクトルを求める。図6 Bは、アセチルコリン受容体チャネルノイズのパワースペクトルを示したもののだが、2つのローレンツ関数の和で表された。すなわち、

$$S(f) = S_1(f) + S_2(f), \quad (11)$$

$$S_j(f) = \frac{S_j(0)}{1 + (f/f_j)^2}. \quad (12)$$

ここで、 f_j はチャネルの特性周波数であり、 $S_j(f_j) = S_j(0)/2$ になる。パワースペクトルが単一のローレンツ関数に従うときは、チャネルの平均開時間 τ と特性周波数 f_1 の間に、 $\tau = 1/(2\pi f_1)$ の関係が成り立つ。しかし、複数のローレンツ関数の和に従うときは、 f_1, f_2 のみから単一チャネルの動特性を解析することは困難である²⁶⁾。しかし、アゴニストの濃度が低いときは、 $1/(2\pi f_1)$ は平均開時間と、 $1/(2\pi f_2)$ は平均バースト時間とほぼ等しいオーダーの値になる⁵⁹⁾。図6 Bにみられるように自律神経節のアセチルコリン受容体チャネルノイズの f_1, f_2 は、ともに、膜電位に依存しており、正の膜電位でより大きな値をとる。このことから、開状態から閉状態への遷移速度に膜電位依存性があることが示唆される。

単一チャネル電流は、次の2つの方法で求められる^{5), 29), 107)}。

$$i_1 = \text{var}^*(I) / \mu_1, \quad (13)$$

$$i_2 = (\pi/2) \sum_j S_j(0) f_j / \mu_1, \quad (14)$$

ただし、 $\text{var}^*(I)$ は、アセチルコリン依存性電流の分散で、フィルタの効果を補正したものである²⁵⁾。上記の区切りごとに分散を求めて加算平均をしたものからベースラインの分散の加算平均を差し引いたものがアセチルコリン依存性電流の分散になる。 μ_1 は、アセチルコリン依存性電流の平均値で、上述の直流記録から求められる。 i_1 は、チャネルの開閉がランダムであるという仮定のもとに導出される一般式(大森の稿、参照)から、チャネルの開確率が小さいときの近似値として求められる。図6の例では、 i_1 と i_2 は、すべての保持電位で良い一致を示した。図6 Cは、単一チャネル電流の $I-V$ プロットで、負の膜電位ではほぼ直線に従いコンダクタンスは 42 pS であった。しかし、正の膜電位でコンダクタンスは減少し、内向き整流特性が認められた。しかし、単一チャネル電流の整流性のみでは、ホールセル電流の内向

き整流特性(図3C)を説明し得ず, N_p にも膜電位依存性が認められた(図6D). 単一チャネル記録においても単一チャネル電流の内向き整流が認められること, および, 正電位側の単一

チャネルコンダクタンスの減少が細胞内 Mg^{2+} に依存していることが後に示された^{62), 91)}.

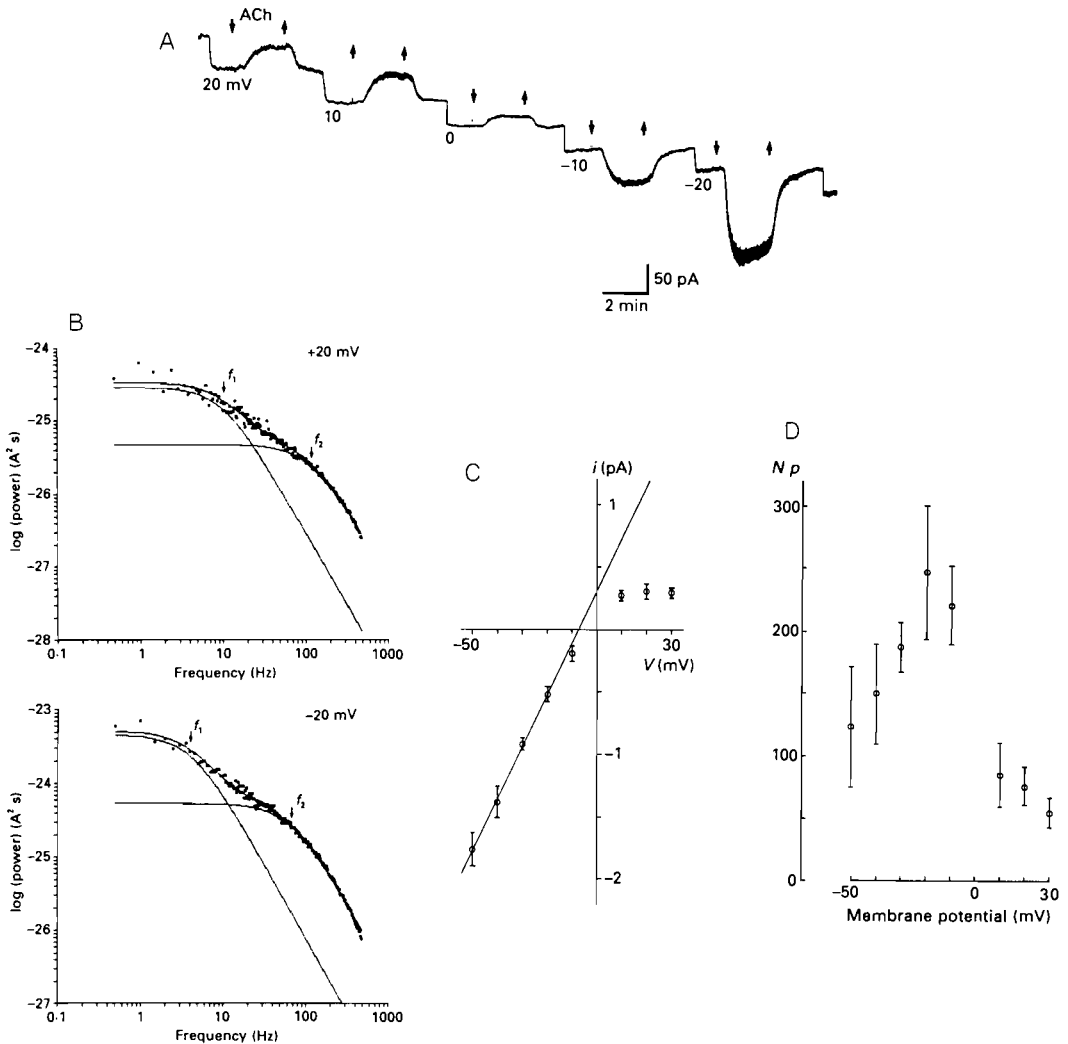


図6. マウス顎下神経節ニューロンのニコチン性アセチルコリン受容体チャネルのホールセルノイズ解析(文献134)

A. ホールセル電流のアセチルコリン応答. 保持電位を +20 mV から -20 mV に変化させている. $\downarrow \uparrow$ 間で 20 μ M のアセチルコリン(ACh)と 10 μ M のネオスチグミンを投与している. アセチルコリンの投与により, 0 mV 近傍で反転する電流が流れるとともにノイズの増大が認められる. B. アセチルコリン誘発性ノイズのパワースペクトル. 実線は, 2つのローレンツ関数およびその和で, 最小2乗法による最適回帰である. +20 mV では, $f_1=10$ Hz, $f_2=117$ Hz, -20 mV では, $f_1=4$ Hz, $f_2=65$ Hz となり, ニコチン性受容体チャネルの開確率に膜電位依存性がある. C. ノイズ解析から求めた単一チャネル電流の電流-電位関係. 直線は, 42 pS のスローコンダクタンスを表している. D. N_p 値の膜電位依存性.

(3) イオンチャネルの構造, 分布, 機能の解析

チャネル構造の解析

イカの巨大神経においては, 細胞内を蛋白分解酵素などで灌流することにより, Na^+ チャネルの不活性化がみられなくなることが知られている^{7), 101), 133)}. これは, チャネルの細胞質側に不活性化に不可欠なドメインが存在し, これが蛋白分解酵素により加水分解されることによると考えられている. 同様の酵素の限定分解を利用したチャネル構造の解析がホールセル記録法を用いることにより, 小細胞についても試みられている^{45), 54)}. これらの実験においては, パッチ電極内液に蛋白分解酵素をいれて, ホールセル状態にすることにより, これを細胞内に投与することが試みられた.

また, Na^+ チャネルの特定の部位に特異的な抗体をパッチ電極内にいれて, Na^+ ホールセル電流を測定し, 不活性化に関与しているドメインが同定された¹³²⁾. Na^+ チャネルは, 6回の膜貫通領域を持つ相似なアミノ酸配列が4つ繰り返す(リピートⅠ~Ⅳ)一次構造を有することが知られている^{56), 98)}. リピートⅢとⅣの間の細胞内セグメントの20個のアミノ酸からなるペプチドに対する抗体により, ホールセル形成からの時間とともに Na^+ 電流の不活性化が遅延することが認められる. しかし, 抗体と同時に抗原ペプチドをパッチ内液に入れると不活性化の遅延は認められなかった. このことから, 抗体が Na^+ チャネルの細胞内セグメントに結合することにより不活性化を阻害したものと解釈される. すなわち, リピートⅢとⅣの間の細胞内セグメントが Na^+ チャネルの不活性化に関与していることが, この実験から示唆された.

チャネル分布の研究

イオンチャネルが担っている細胞機能を解析する上において, チャネルの密度は重要な情報を提供する. 例えば, 副腎髄質細胞には, 促進型(図7A), P型(B), N型(C)の3種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプが同定されており,

その各々が薬理的に分離可能である. この細胞の Ca^{2+} チャネルを流入する Ca^{2+} イオンあたりの膜容量の増加を比較すると, 促進型 Ca^{2+} チャネルはP型, N型よりも約5倍効率がよいことが示された(図7D). ホールセル記録下で細胞の膜容量の増加は開口分泌に対応することから, 促進型 Ca^{2+} チャネルが開口放出部位近傍に局在していることが示唆される⁹⁾.

一般に, イオンチャネルの分布は局在していることが知られており, これは細胞機能と密接な関係がある. 有毛細胞の Ca^{2+} 流入にともなう Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流は, パッチ電極から Ca^{2+} キレート剤の EGTA を細胞内に投与することにより抑制を受けないのに対し, BAPTA を投与することにより抑制される¹¹⁰⁾. EGTA と BAPTA の Ca^{2+} 結合能はほぼ等しいが, BAPTA のほうが EGTA よりも Ca^{2+} と結合する速度が大きい. この実験結果は, Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルが Ca^{2+} チャネルに近接して分布していることを示すものである^{44), 76), 111), 112)}.

神経細胞は, 極性を持つ細胞の代表的なものである. 樹状突起の膜電位は, 胞体に伝えられて統合され, 軸索の initial segment における膜電位が閾値以上に達したときに活動電位が発生し, 軸索を伝播する. シナプス終末に活動電位が到達することにより, 伝達物質が放出され, シナプス後膜の膜電位を変化させる. 神経細胞においては, 胞体, 樹状突起, シナプス終末それぞれからホールセル記録が試みられている. 例えば, 大脳皮質ニューロンにおいては, 胞体と樹状突起から同時にホールセル電流固定記録が試みられている¹²¹⁾. 胞体と樹状突起から活動電位が記録されるが, 樹状突起においたパッチ電極内の Na^+ チャネルブロッカーの QX 314 が拡散するにつれて, 樹状突起の活動電位のみが減弱する. すなわち, 樹状突起にも Na^+ チャネルが存在しており, 樹状突起に活動電位が伝播することが示された¹²²⁾. 神経終末は, 一般に微小であるが, 例外的に大型の終末に対して, ホールセル記録が適用できる. このようにして神経終末から, Ca^{2+} 電流(図3A, B)⁵³⁾.

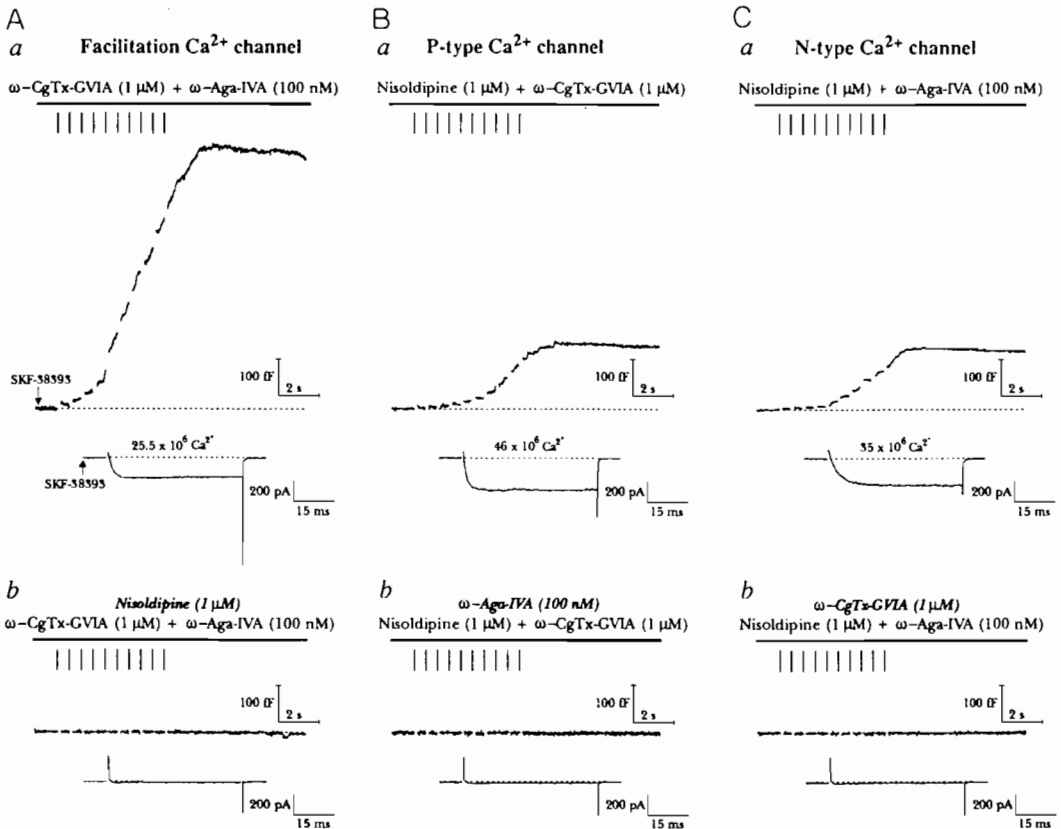


図7. 副腎随質クロム親和性細胞の3種類の Ca^{2+} チャネルサブタイプに依存する開口分泌 (文献9)

各図とも、上段は膜電位固定パルスプロトコールを、中段は膜容量を、下段は Ca^{2+} 電流を示している。A. a, N型 Ca^{2+} チャネル, P型 Ca^{2+} チャネルをそれぞれ, ω -コノトキシン ($\omega\text{-CgTx-GVIA}$), ω -アガトキシン ($\omega\text{-Aga-IVA}$) で抑制し, ジヒドロピリジンアゴニスト SKF-38393 存在下に, 促進型 Ca^{2+} チャネルが活性化される。b, ジヒドロピリジンアンタゴニスト nisoldipine により, 促進型 Ca^{2+} チャネル電流が抑制されるとともに, 開口分泌が抑制される。B. P型 Ca^{2+} チャネルは, nisoldipine と $\omega\text{-CgTx-GVIA}$ の存在下に単離される。C. N型 Ca^{2+} チャネルは, nisoldipine と $\omega\text{-Aga-IVA}$ の存在下に単離される。54例の細胞から, 促進型, P型, N型, それぞれのチャネルによって運ばれる Ca^{2+} の数は, 25.5×10^6 , 46×10^6 , 35×10^6 イオンと推定される。また, それぞれのチャネルの活性化により開口分泌される小胞数は, 356(促進型), 88(P型), 83(N型)個と算出される。

78), 79), 119), 125), 136), K^+ 電流^{78), 130)}, Na^+ 電流⁷⁸⁾が測定されている。神経細胞が分化するときに突起の先端に生長錐が形成される。このような生長錐の大きなものにホールセル記録法が試みられている^{52), 88)}。胞体からホールセル記録をしながら, 局所的に溶液を灌流する方法により, 生長錐のイオン電流が測定されている^{46), 120)}。

(5) 担体輸送の性質および機能の解析 (木村の稿参照)

担体輸送にともなって電荷の移動が起こるとき, ホールセル記録下で電流として捉えられる。たとえば, 形質膜の Na/K ポンプは, ATP 1分子を加水分解することにより, 3個の Na^+ イオンを細胞内から細胞外へ輸送すると同時に2個の K^+ イオンを細胞外から細胞内へ輸送

する³²⁾。すなわち、ポンプ反応の1サイクルにともなう、差し引き1個の電子が形質膜を横切って細胞外から細胞内に移動する(electrogenic pump)。これは、ホールセル記録下に外向きの電流として観察される^{41), 42), 92)}。

この様に非対称的なイオンの輸送にともなう電荷の移動が認められるものの代表として、Na/Ca 交換輸送が挙げられる⁷⁴⁾。Na/Ca 交換輸送はエネルギーの消費を伴わずに、 Ca^{2+} 1分子を細胞内から細胞外へ輸送すると同時に、差し引き1個の正電荷を細胞外から細胞内に移動させる^{19), 35), 73)}。桿体の外節においては、4個の Na^+ が細胞外から細胞内に輸送されるにともなう、1個の Ca^{2+} と1個の K^+ が細胞内から細胞外へ移動することが報告されている²²⁾。同様のメカニズムが神経細胞に共通であることが示唆されている⁷⁴⁾。しかし、心筋細胞においては、 K^+ の共役輸送は認められず、 Na^+ と Ca^{2+} が3:1の比で交換輸送されることが報告されている^{28), 35), 108)}。いずれの場合も静止膜電位近傍では内向きの電流として測定される。エネルギー消費を伴わない担体輸送一般の特徴として、Na/Ca 交換輸送は、可逆的に機能する^{14), 74)}。Na/Ca 交換輸送電流が反転する電位は次式で与えられる。

$$E_{\text{Na/Ca}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Ca}]_i [\text{Na}]_o^4 [\text{K}]_i}{[\text{Ca}]_o [\text{Na}]_i^4 [\text{K}]_o} \\ = 4E_{\text{Na}} - E_{\text{K}} - 2E_{\text{Ca}} \quad (15) \\ (4\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}, 1\text{K}^+ \text{の時})$$

または、

$$E_{\text{Na/Ca}} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{Ca}]_i [\text{Na}]_o^3}{[\text{Ca}]_o [\text{Na}]_i^3} \\ = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}} \quad (16) \\ (3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+} \text{の時})$$

ここで、 E_{Na} 、 E_{Ca} は、それぞれ、 Na^+ および Ca^{2+} の平衡電位である。すなわち、 $E_{\text{Na/Ca}}$ よりも正電位側では、 Ca^{2+} は細胞外から細胞内に取り込まれ、このとき外向きの Na/Ca 交換輸送電流が観察される。

中枢神経系の興奮性伝達物質のグルタミン酸は、酸性アミノ酸担体輸送により、細胞外から

細胞内に濃度勾配に逆らって取り込まれる。1分子のグルタミン酸(glutamate^-)の輸送にともなう、3個の Na^+ (または2個の Na^+ と1個の H^+) が細胞外から細胞内に、1個の K^+ が細胞内から細胞外に共役輸送される⁹⁹⁾。しかし、グリア細胞においては、3個の Na^+ と1分子のグルタミン酸の細胞外から細胞内への輸送と共役して、1個の Na^+ が細胞内から細胞外に輸送されるという報告¹¹⁴⁾と、2個の Na^+ と1分子のグルタミン酸の細胞外から細胞内への輸送と共役して、1個の K^+ と1個の OH^- (HCO_3^-) が細胞内から細胞外へ輸送されるという報告がある¹⁷⁾。いずれの場合もグルタミン酸1分子の取り込みにともなう、1個の正電荷が細胞外から細胞内に移動する。すなわち、ホールセル電位固定下に、グルタミン酸の取り込みにともなう内向きの電流が観察される。反対にグルタミン酸の逆輸送にともなう外向き電流が測定される¹²⁴⁾。

担体輸送の研究において、ホールセルパッチ法は放射性同位元素によるトレース法に比べて、(1) 細胞の膜電位をコントロールすることができる、(2) ミリ秒単位の速い現象を捉えることができる¹⁰⁰⁾、(3) 細胞内外のイオン組成をコントロールすることができる、の3点において優れている。ホールセルパッチ法の導入により、担体輸送の定量的研究が飛躍的に進んだ。

(6) 細胞内情報伝達系の解析

前述のようにホールセルパッチ法により細胞内に様々な物質を投与することができる。これにより、細胞内情報伝達系の解析が数多く行われており、枚挙にいとまない。具体的には、榎本、野間、堀江の稿を参照されたい。

(7) 形質膜融合の測定

細胞質に存在する小胞と形質膜が融合する(開口分泌、エクソサイトーシス)ことにより、新しく合成された膜脂質、膜蛋白、細胞間マトリックス蛋白などが供給される。また、分泌細胞は、ホルモンや伝達物質を細胞外に放出し、

情報を他の細胞に伝える。これとは反対に、形質膜が小胞として取り込まれる(エンドサイトーシス)ことにより、細胞の表面積はほぼ一定に保たれる。生体膜は、およそ $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ の比容量をもっているため、エクソサイトーシスやエンドサイトーシスにともなう、細胞の膜容量が変動する。すなわち、ホールセル電位固定下に、細胞の膜容量を測定することにより、エクソサイトーシスおよびエンドサイトーシスを定量的に測定することができる。膜容量測定法については、丸山の稿で詳説する。

Beige マウスのマスト細胞のように大きな分泌顆粒をもった細胞では、ホールセル電位固定下に、膜融合に同期した一過性の電流が観察される¹⁸⁾。一般に形質膜を介する電位と顆粒膜を介する電位は異なっており、顆粒膜の方がより顆粒内が正になるような電位を有している。これは、分泌顆粒膜に起電性の H^+ ポンプが

存在することによると考えられている。分泌顆粒と形質膜の間に交通(fusion pore)が形成されることにより、顆粒膜から形質膜へ次式で与えられる電荷が移動する。

$$Q_V = C_V (E_C - E_V) \quad (17)$$

ここで、 C_V は、顆粒膜容量を、 E_C , E_V は、それぞれ、形質膜および顆粒膜を介する電位を表す。この様にして測定される fusion pore の形成がエクソサイトーシスに先行することが示されている¹¹⁸⁾。

(8) バイオセンサーとして

細胞の表面には、様々な生理活性物質に特異的な受容体が存在しており、受容体にそのリガンドが結合することにより、固有の細胞応答が観察される。この受容体の特異性と高い感受性を利用して、細胞そのものあるいは細胞膜パッチを生理活性物質のセンサーとして用いること

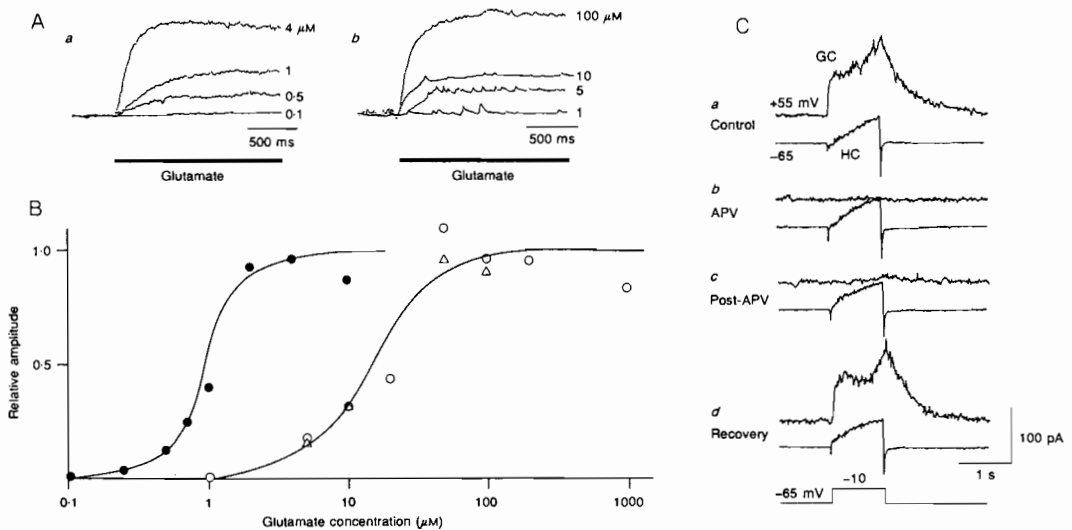


図 8. チック内耳有毛細胞の伝達物質放出検知システム(文献68)

A. ラット小脳の顆粒細胞(a), プルキニエ細胞(b)のグルタミン酸応答。保持電位はともに +55 mV, 各々のトレースは、異なる濃度のグルタミン酸に対する応答で、顆粒細胞, プルキニエ細胞, それぞれ 1 μM, 10 μM 応答に対する相対値で表されている。B. 顆粒細胞(●), プルキニエ細胞(○, △)のグルタミン酸に対する薬量-反応曲線。プルキニエ細胞に比べ顆粒細胞は、10倍以上感受性が高い。C. 有毛細胞と小脳顆粒細胞を近接させて、有毛細胞に -65 mV の保持電位から -10 mV の脱分極性パルスで 500 ms 通電したときの有毛細胞応答(下段)と顆粒細胞応答(上段)。a, コントロール。b, APV (200 μM) 投与の効果。c-d, APV を除去することにより、顆粒細胞応答が徐々に回復する。

ができる。アウトサイドアウトのパッチ膜⁴⁸⁾、⁶¹⁾、¹³⁷⁾あるいは、インサイドアウトのパッチ膜⁷¹⁾をセンサーに用いたものについては、本稿では説明しない。本稿では、内耳有毛細胞の放出する伝達物質の同定⁶⁸⁾を例にして、その方法の概略を説明する。

聴覚の一次感覚細胞の内耳有毛細胞は蝸牛神経節に由来する求心性線維との間にシナプスを形成している。蝸牛神経節細胞は高いグルタミン酸感受性を有することから有毛細胞から放出される伝達物質はグルタミン酸であると推測される。これを検討する目的で小脳顆粒細胞をグルタミン酸のセンサーとして用いた。小脳顆粒細胞には、グルタミン酸 NMDA 受容体が多く発現しており、高いグルタミン酸感受性を示す。図 8 A, B は小脳顆粒細胞と小脳プルキニエ細胞のホールセル記録下におけるグルタミン酸感受性を比較したものである。小脳顆粒細胞はプルキニエ細胞に比べ 10 倍以上高い感受性を示し、 $1\mu\text{M}$ 以下のグルタミン酸に対しても十分応答する。これは、プルキニエ細胞にはおもに AMPA 受容体が発現しており、一般に NMDA 受容体よりもグルタミン酸感受性が低いことにより説明される。有毛細胞と小脳顆粒細胞を接触させた状態で、両方の細胞にニスタチン穿孔パッチ法(後述)を適用する。小脳顆粒細胞を $+55\text{ mV}$ にホールセル電位固定して、有毛細胞に -65 mV の保持電位から -10 mV のパルスを与えると、有毛細胞の電流応答に同期して、顆粒細胞から外向きの電流応答が測定される(図 8 C, a)。この時、有毛細胞には内向きの Ca^{2+} 電流に引き続いて外向きの K^{+} 電流が流れたものと考えられる。顆粒細胞応答は、NMDA 受容体阻害薬の 2-amino-5-phosphonovaleate (APV) により可逆的に阻害されることから、NMDA 受容体チャネル応答であることが確認される(図 8 C, b-d)。すなわち有毛細胞から Ca^{2+} 依存性に放出される伝達物質は、グルタミン酸あるいは類似の NMDA アゴニスト活性をもった興奮性アミノ酸であることが明らかになった。グルタミン酸であると

仮定すると小脳顆粒細胞表面における濃度は約 $0.5\mu\text{M}$ であると推測される。

同様に、様々な細胞のホールセル標本をセンサーとして、生理活性物質の計測が可能である。たとえば、ナマズ網膜水平細胞をセンサーにして、キンギョ網膜双極細胞の巨大神経終末からグルタミン酸あるいは類似の興奮性アミノ酸が Ca^{2+} 依存性に放出されることが報告されている¹²⁵⁾、¹²⁶⁾。

(9) 単一細胞における遺伝子発現の解析

ホールセルパッチ法により単一の細胞から mRNA を抽出して、その細胞の遺伝子発現を解析することが最近試みられている。脳のようにヘテロな細胞から構成される組織においては、個々の細胞で遺伝子の発現が異なっている。ホールセルパッチ法を用いた mRNA 解析法は、次のような利点がある。(1) 同定された細胞種における遺伝子発現を解析できる。すなわち、他種細胞の混入がない。(2) 形態的、電気生理学的な性質と遺伝子の発現を比較することができる。本手法を用いることにより、(1) 細胞特異的に発現する未知の遺伝子のクローニング、(2) 組織レベルでクローニングされた遺伝子の細胞特異的な発現の解析、(3) 単一細胞の cDNA ライブラリの作成、(4) 細胞特異的な遺伝子発現調節機序の解析、(5) mRNA 転写レベルとチャネルや受容体などのタンパク質発現レベルとの比較およびその調節機序の解析、などが可能になり、今後の発展が期待される。

単一細胞に存在する mRNA の量はきわめて僅か(細胞あたり約 1 pg)なので、これを増幅する必要がある。本稿では、現在試みられている 2 種類の増幅法の概要を紹介する。詳細は個々の論文を参照されたい。

逆転写酵素とオリゴ(dT)-T7プライマーを注入する方法(図 9)³³⁾、¹³¹⁾

① 細胞の mRNA と接触し得る溶液、器具等は、すべてオートクレイブにかけるか diethylpyrrocarbonate で処理することにより、RNA 分解

酵素を不活性化する。特にパッチ電極の処理が重要である。またこれらの器具や溶液を取り扱う際には手袋をして、汗に含まれる RNA 分解酵素が付着しないように注意する。

② パッチ電極に dATP, dGTP, dCTP, dTTP などのデオキシヌクレオチド、逆転写酵素、オリゴ(dT)-T7プライマーを含んだ内液を充填し、ホールセル状態にする。内液は、細胞内に拡散し、polyA-mRNA とオリゴ(dT)-T7プライマーが結合する。

③陰圧により細胞質を電極内に吸引し、電極先端を折ってマイクロチューブにいれ、37℃ 1時間インキュベーションする。この過程で単一鎖の cDNA が合成される。

④ 単一鎖の cDNA を抽出し、DNA ポリメラーゼにより二重鎖 cDNA を形成する。

⑤ 二重鎖 cDNA を抽出し、T7-RNA ポリメラーゼによりアンチセンス RNA を合成し、抽出する(第1回増幅)。第一回増幅により2000倍

の収量が得られる。

⑥ 以上の増幅操作を繰り返すことによりさらに多くのアンチセンス RNA を得ることができ(第2回増幅)。このアンチセンス RNA をプローブとして用いることにより、組織から得られた cDNA ライブラリをもとに cDNA クローンを得ることができる。

また、アンチセンス RNA の収量から細胞における mRNA の発現量を推定することができる。

PCR (polymerase chain reaction) 増幅法を用いる方法^{15), 75)}

① 前記の方法はパッチ内液に酵素を含んでいるためにタイトシールを形成するのが困難なことがある。本法では逆転写酵素を含まない通常のパッチ内液を用いる。溶液、器具の取扱いに関しては、前記手法と同様の注意が必要である。

② ホールセル状態の後、陰圧により細胞内成分を可能な限り吸引する。

③電極内容物をマイクロチューブにいれ、逆転写酵素、デオキシヌクレオチドなどの存在下に35~37℃で1時間インキュベーションすることにより単一鎖の cDNA を合成する。

④ (PCR 増幅) PCR 増幅法の詳細については他書^{4), 37), 63), 113)}を参照されたい。本法では、既知の cDNA 配列をもとに、同一あるいは類似の配列を有する cDNA を効率よく増幅することができる。ゆえに、未知の分子の cDNA を取り出す目的には適さないが、標的を絞って細胞における mRNA の発現を解析する場合にきわめて有効である。PCR 増幅に当たっては、5' 側(up)のセンスプライマーと 3' 側(down)のアンチセンスプライマーを用意する必要がある。これらのプライマーの配列は、増幅しようとする cDNA を最も効率よく認識するように決定する。通常のプライマーの長さは15~20ベースである。

⑤ up のプライマー存在下に、細胞から取り出した cDNA をテンプレートにして、DNA 合成酵素により、2重鎖の DNA を合成する。こ

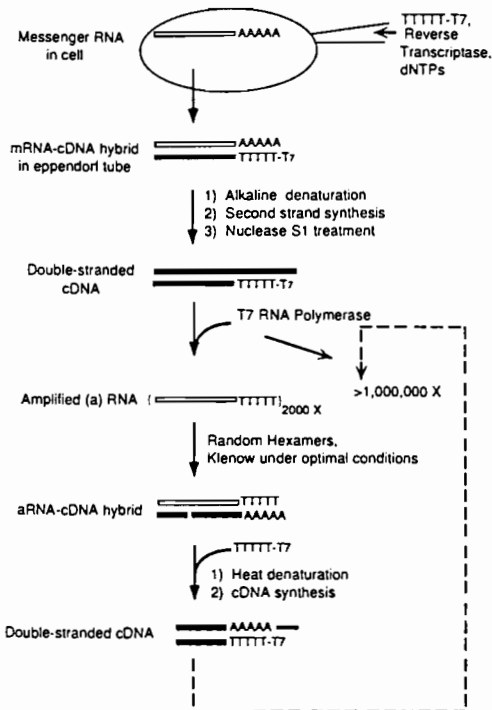


図9. 単一細胞における遺伝子発現解析法の概要(文献33)。

れを単一鎖に解離して、それぞれをテンプレートにして、up および down のプライマーを結合させ、DNA 合成酵素により、2重鎖のDNAを合成する。この操作を繰り返すことにより、DNAを増幅する。

穿孔パッチ法

(1) ホールセルパッチ法の限界・問題点

ホールセル状態になると同時に細胞内液は、パッチ電極内液により灌流される(washout)。これは、特に小細胞で顕著な影響を及ぼす。すなわち、ホールセル状態は、細胞にとっては人工的な環境である。ホールセルパッチ法は、細胞内液を実験的にコントロールすることを可能にする反面、細胞の正常な機能を損なう危険性をはらんでいる。たとえば、細胞内に存在する可溶性の機能的分子が失われる。これら機能的分子には、チャネル活動性の維持や細胞内の情報伝達機序を担っているものがある。ホールセル記録下でしばしば認められる Ca^{2+} チャネルの rundown は、この様な機序により説明される^{12), 54), 67), 116)}。また、ホールセル記録では、しばしば、受容体を介する情報伝達機序が失われる⁵⁹⁾。細胞内の Ca^{2+} バッファ能力の変化も、ホールセルパッチ法の問題点である^{11), 93), 95)}。

パッチ内液に washout されると考えられる物質をあらかじめ補うことにより、上記の問題点はある程度解消される。たとえば、パッチ内液に Mg^{2+} ATP, cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性サブユニット, leupeptin などのプロテアーゼ阻害物質, 強い Ca^{2+} バッファなどを補うことにより、 Ca^{2+} 電流の rundown を抑えることができる。しかし、washout により失われる物質のほとんどは未知である。また、正常の細胞では、機能的分子のダイナミックな量的・質的変動が機能を担っていることが多い。パッチ内液にある場合は、機能的分子の濃度が固定されてしまうためこの様な側面が捉えられない欠点がある。

(2) 穿孔パッチ法の原理

穿孔パッチ法は、以上のようなホールセルパッチ法の欠点を解消する最も有効な手法である。穿孔パッチ法では、膜を破る代わりにパッチ膜にイオン透過性の高い小孔を形成することにより細胞内への電気的アクセスを可能にする。この様な小孔は、サイズの小さい1価イオンを通すが、大きな分子を通さないで、細胞内環境が損なわれない利点がある。この cell-attached の状態から out-side out の状態にすることにより、細胞質の可溶性成分を失わずに単一チャネル活動を記録することができる(perforated vesicle)⁸⁰⁾。また、ホールセル膜容量を測定することにより、長時間にわたり安定した開口分泌をモニターすることができる⁴³⁾。この様な測定法は、最初にマスト細胞で試みられた⁸¹⁾。マスト細胞、マクロファージ、Tリンパ球、癌由来系統細胞のあるものなどには、 ATP^{4-} に対する受容体が存在しており、 ATP^{4-} が結合することにより小分子を透過する小孔が形成される³⁶⁾。マスト細胞では、ATPを内液に含むパッチ電極で cell-attached 状態にすることにより、細胞内への電気的アクセスが可能である。しかし、アクセス抵抗が比較的高く、適用できる細胞種が限られているなどの欠点がある。

ニスタチン、アムフォテリシンBなどのポリエン抗生物質は脂質二重層内でチャネルを形成する。ニスタチンチャネルは以下のような性質をもっている^{57), 59), 89)}(文献58, 69を参照)。

① Na^+ , K^+ , Li^+ , Cs^+ , Cl^- などの1価イオンを選択的に透過するが、陽イオンの方が透過性が高い。しかし、 Ca^{2+} , Mg^{2+} , その他の多価イオンに対する透過性は非常に低い。②チャネルの透過性は、電位依存性をほとんど示さない。③形質膜の外から与えたニスタチンは細胞内に入らない。また、パッチ膜から外へ側方拡散しない。④直径0.8nm以上、あるいは、分子量200以上の分子は、ニスタチンチャネルを透過しない。すなわち、ほとんどの細胞内の機能的分子を通さない。

アムフォテリシンBは、ニスタチンの代用として用いられ、ニスタチンよりも低いアクセス抵抗が得られるという報告がある¹⁰⁶⁾。

(3) 実験手技

実験手技の概要は、他書を参照されたい⁴⁷⁾ 58), 69), 106)。本稿では、著者らが開発したニスタチン-フルオレシン(N-F)法を紹介する¹³⁵⁾。従来の方法では、パッチ電極の先端をニスタチンを含まない溶液で満たす必要があった。これは、ニスタチン粒子が存在していると、形質膜とパッチ電極の間にタイトシールを形成することが困難なことに起因している。本法では、電極の先端までニスタチン溶液を充填することができる。このため、タイトシール形成後速やかに穿孔パッチが形成される利点がある。また、陽圧をかけつつパッチ電極を細胞表面に近づけることができるので、細胞表面が付着物で覆われているような標本に対してもニスタチン穿孔パッチ法が適用できる。

① 電極作成

パッチ電極は、通常のホールセル記録に用いるものと大きな違いはないが、先端径の大きいほど、また、先端角の大きいほどアクセス抵抗が小さくなる。水溶液と膜脂質の間の分配係数に従ってニスタチンチャネルの密度に上限が設定されるので、パッチ膜の面積が大きいほどアクセス抵抗が小さくなる。

② N-Fストック溶液の作成

ニスタチン(Sigma社製)5mgとフルオレシンナトリウム(Uranine, ナカライテスク社製)20mgを1mlのメタノールに溶解する。すなわち、ニスタチンとフルオレシンのモル比は、約1:10になる。N-Fストック溶液は、4℃で遮光保存すれば数日間は無効である。

③ パッチ内液の作成

N-Fストック溶液50μlをポリエチレンチューブにとり、窒素ガスでメタノールを蒸発させる。完全に乾燥させて、パッチ内液を1ml加え、よく振盪する。最終的なニスタチン、フルオレシンの濃度はそれぞれ、250μg/ml、

1mg/mlになる。ニスタチン濃度は、実験に応じて調整することが望ましい。ニスタチン濃度が高いほどアクセス抵抗が小さくなるが、200~300μg/ml付近ではほぼ飽和に達するようである。フルオレシンの励起によりニスタチンの活性が失われるので、本操作ならびに以下の操作は、すべて、フルオレシンを励起する青色光をカットして行う必要がある。著者らは、黄色の単色蛍光灯(松下EL40SY-F)を室内照明に用いることにより良好な結果を得ている。

④ パッチ内液の充填

N-Fパッチ内液はセルロースアセテートフィルター(東洋濾紙, Dismic-3cp)を通して電極内に充填する。著者らは、あらかじめパッチ電極の先端を濾過したN-Fパッチ内液に10~30秒間浸した後、同じ液をバックフィルしている。先端の空気は、電極をタッピングする事により容易に除去される。ニスタチンを含んだパッチ内液は1~2時間ごとに新鮮なものに取り替える。

⑤ 穿孔パッチ膜の形成

通常のパッチ電極法と同様に、陽圧下にパッチ電極を細胞表面に接近させる。この時、顕微鏡照明もフィルターを通して青色の励起光をできる限りカットする。著者らは543nmにピークを持つ干渉フィルターを用いているが、フルオレシンの励起光スペクトルの幅が広いので、電極が細胞表面に到達した段階で照明を切っている。ここで僅かに陰圧に切り替え、保持電位を負電位側に移行させながら、タイトシールを形成する。過分極パルスを連続的に加えながら電流をモニターすると速やかに容量性電流が増大するのが認められる。すなわち、ニスタチンチャネルが形成されて、細胞内に対して電氣的にアクセスし始める。本法では、パッチ膜の穿孔がきわめて速やかに始まるので、タイトシールの形成過程で容量性電流の増大が認められることがある。アクセス抵抗は、徐々に低下し、20分以内に安定する。その大きさは、電極抵抗の5~10倍である。陽圧をかけながらパッチ電極を細胞に近づける際に、細胞がパッチ内液に

曝される。しかし、細胞機能には殆ど影響がない。また、細胞の入力抵抗もホールセルパッチ法で測定した値とほぼ等しい。これは、一過性にニスタチンが形質膜に溶け込んでも、パッチ膜の外側では、液が速やかに洗い流されるために、形質膜から細胞外液にニスタチンが移行することによると考えられる。フルオレシンは、細胞の表面に残留するが、生理機能には殆ど影響が認められない。

⑥ N-F 穿孔パッチ膜の光感受性

パッチ電極のアクセス抵抗は、光を照射しない限り安定して低い値を保ち得る。しかし、フルオレシンを励起する青色光を照射すると、アクセス抵抗が速やかに上昇する。これは、励起状態にあるフルオレシンがニスタチンチャネルの形成を阻害することによると考えられる。この性質は、穿孔パッチ膜が破壊されていないかをチェックするのに用いることができる。蛍光像を顕微鏡下で観察することによっても穿孔パッチ膜が破壊されていないかを判定することができる。

(4) N-F 法と従来の手法との比較

- ① 上述したように、N-F 法は、通常のパッチ電極法と殆ど同様の手技で穿孔パッチ膜を形成することができる。自律神経節などのように細胞表面に付着物が多い標本では、陽圧を加えながらパッチ電極をアプローチすることのできる N-F 法の方が従来の手法よりも成功率が高い。
- ② N-F 法では、パッチ電極の先端までニスタチンを含んだ溶液を満たすことができるので、速やかに穿孔パッチ膜が形成される。
- ③ N-F 法では、DMSO やメタノールのような有機溶媒がパッチ内液に存在しないため、これら有機溶媒の副作用がない。
- ④ N-F 法は、光感受性があり、フルオレシンの励起光でニスタチンが不活性化される欠点がある。しかし、室内照明、顕微鏡照明の励起光波長をカットすることにより、光感受性をほぼ完全に防ぐことができる。

⑤ 穿孔パッチ法では、パッチ膜が破壊されていないことが重要である²³⁾。N-F 法では、蛍光像を観察することにより、あるいは、アクセス抵抗の光感受性を指標にして、パッチ膜が維持されているかを判定することができる。

あらゆる測定法は、その長所とするところが同時にその測定法の欠点になる。測定するという行為そのものが人工的な影響を細胞に及ぼす(測定法の不確定性)。ホールセルパッチ法と穿孔パッチ法は、それぞれの欠点を補い合う形にある。両者をうまく組み合わせることにより、生理的な細胞機能の解析がさらに進歩するものと期待される。

追記：赤池・原田により、穿孔パッチ法に関しての優れた総説が発表された(Akaike & Harata, *Jpn. J. Physiol.*, 1994)ので、本法を試みる人が一読されることを薦める。

参 考 文 献

- 1) Adams, B. A., Tanabe, T., Mikami, A., Numa, S. & Beam, K. G. (1990) Intramembrane charge movement restored in dysgenic skeletal muscle by injection of dihydropyridine receptor cDNAs. *Nature* **346**, 569-572.
- 2) Adams, P. R. (1977a) Relaxation experiments using bath-applied suberyldicholine. *J. Physiol. Lond.* **268**, 271-289.
- 3) Adams, P. R. (1977b) Voltage jump analysis of procaine action at frog end-plate. *J. Physiol. Lond.* **268**, 291-318.
- 4) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994) "Molecular Biology of The Cell. 3rd Ed." Garland Publishing Inc. New York, pp. 316-318.
- 5) Anderson, C. R. & Stevens, C. F. (1973) Voltage clamp analysis of acetylcholine produced end-plate current fluctuations at frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* **235**, 655-691.
- 6) Armstrong, C. M. (1992) Voltage-dependent ion channels and their gating. *Physiol. Rev.* **72**, S5-S13.
- 7) Armstrong, C. M., Bezanilla, F. M. & Rojas, E. (1973) Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J. Gen. Physiol.* **62**, 375-391.
- 8) Armstrong, C. M. & Gilly, W. F. (1992) Access

- resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods Enzymol.* **207**, 100-122.
- 9) Artalejo, C. R., Adams, M. E. & Fox, A. P. (1994) Three types of Ca^{2+} channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* **367**, 72-76.
 - 10) Ascher, P., Large, W. A. & Rang, H. P. (1979) Studies on the mechanism of action of acetylcholine antagonists on rat parasympathetic ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* **295**, 139-170.
 - 11) Beech, D. J., Bernheim, L., Mathie, A. & Hille, B. (1991) Intracellular Ca^{2+} buffers disrupt muscarinic suppression of Ca^{2+} current and M current in rat sympathetic neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **88**, 652-656.
 - 12) Belles, B., Malecot, C. O., Hescheler, J. & Trautwein, W. (1988) "Run-down" of the Ca current during long whole-cell recordings in guinea pig heart cells, role of phosphorylation and intracellular calcium. *Pflugers Arch.* **411**, 353-360.
 - 13) Blanton, M. G., Lo Turco, J. J. & Kriegstein, A. R. (1989) Whole cell recording from neurons in slices of reptilian and mammalian cerebral cortex. *J. Neurosci. Meth.* **30**, 203-210.
 - 14) Blaustein, M. P. (1988) Calcium transport and buffering in neurons. *Trends Neurosci.* **11**, 438-443.
 - 15) Bochet, P., Audinat, E., Lambolez, B., Crépel, F., Rossier, J., Iino, M., Tsuzuki, K. & Ozawa, S. (1994) Subunit composition at the single-cell level explains functional properties of glutamate-gated channel. *Neuron* **12**, 383-388.
 - 16) Bormann, J., Hamill, O. P. & Sakman, B. (1987) Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol. Lond.* **385**, 243-286.
 - 17) Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A. & Attwell, D. (1992) The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**, 471-474.
 - 18) Breckenridge, L. J. & Almers, W. (1987) Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* **328**, 814-817.
 - 19) Bridge, J. H. B., Smolley, J. R. & Spitzer, K. W. (1990) The relationship between charge movements associated with I_{Ca} and $I_{\text{Na-Ca}}$ in cardiac myocytes. *Science* **248**, 376-378.
 - 20) Brown, A. M., Wilson, D. L. & Tsuda, Y. (1985) Voltage clamp and internal perfusion with suction-pipette method. in "Voltage and patch clamping with microelectrodes", eds. T. G. Smith, Jr., H. Lecar, S. J. Redman & P. W. Gage, American Physiological Society, Bethesda, Maryland, USA, pp. 151-169.
 - 21) Byerly, L. & Hagiwara, S. (1982) Calcium currents in internally perfused nerve cell bodies of *Limnea stagnalis*. *J. Physiol. Lond.* **322**, 503-528.
 - 22) Cervetto, L., Lagnado, L., Perry, R. J., Robinson, D. W. & McNaughton, P. A. (1989) Extrusion of calcium from rod outer segments is driven by both sodium and potassium gradients. *Nature* **337**, 740-743.
 - 23) Chung, I. & Schlichter, L. C. (1993) Criteria for perforated-patch recordings, ion currents versus dye permeation in human T lymphocytes. *Pflugers Arch.* **424**, 511-515.
 - 24) Coleman, P. A. & Miller, R. F. (1989) Measurement of passive membrane parameters with whole cell recording from neurons in the intact amphibian retina. *J. Neurophysiol.* **61**, 218-230.
 - 25) Colquhoun, D., Dreyer, F. & Sheridan, R. E. (1979) The actions of tubocurarine at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. Lond.* **293**, 247-284.
 - 26) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1977) Relaxation and fluctuations of membrane currents that flow through drug-operated channels. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **199**, 231-262.
 - 27) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1983) The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. in "Single-channel recording", eds. B. Sakmann & E. Neher, Plenum, New York, NY, USA, pp. 135-175.
 - 28) Crespo, L. M., Gratham, C. J. & Cannell, M. B. (1990) Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* **345**, 618-621.
 - 29) Cull-Candy, S. G., Howe, J. R. & Ogden, D. C. (1988) Noise and single channels activated by excitatory amino acids in rat cerebellar granule neurones. *J. Physiol. Lond.* **400**, 189-222.
 - 30) Cull-Candy, S. G. & Usowicz, M. M. (1987) Multiple-conductance channels activated by excitatory amino acids in cerebellar neurons. *Nature* **325**, 525-528.
 - 31) Delcour, A. H. & Tsien, R. W. (1993) Altered prevalence of gating modes in neurotransmitter inhibition of N-type calcium channels. *Science* **259**, 980-984.
 - 32) De Weer, P., Gadsby, D. C. & Rakowski, R. F. (1988) Voltage-dependence of the Na/K pump. *Annu. Rev. Physiol.* **50**, 225-241.
 - 33) Eberwine, J., Yeh, H., Miyashiro, K., Cao, Y., Nair, S., Finnel, R., Zettel, R. & Coleman, P. (1992) Analysis of gene expression in single live neurons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**, 3010-3014.
 - 34) Edwards, F. A., Konnerth, A., Sakmann, B. & Takahashi, T. (1989) A thin slice preparation for patch clamp recordings from neurones of the mammalian central nervous system. *Pflugers*

- Arch. **414**, 600-612.
- 35) Ehara, T., Matsuoka, S. & Noma, A. (1989) Measurement of reversal potential of Na^+ - Ca^{2+} exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. Lond.* **410**, 227-249.
 - 36) El-Moatassim, C., Dornand, J. & Mani, J.-C. (1992) Extracellular ATP and cell signalling. *Biochim. Biophys. Acta* **1134**, 31-45.
 - 37) Erlich, H. A. ed., "PCR Technology, Principles and Applications for DNA Amplification." Stockton, New York, 1989.
 - 38) Fenwick, E. M., Marty, A. & Neher, E. (1982) A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol. Lond.* **331**, 577-597.
 - 39) Field, A. C., Hill, C. & Lamb, G. D. (1988) Asymmetric charge movement and calcium currents in ventricular myocytes of neonatal rat. *J. Physiol. Lond.* **406**, 277-297.
 - 40) Forscher, P. & Oxford, G. S. (1985) Modulation of calcium channels by norepinephrine in internally dialyzed avian sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* **85**, 743-763.
 - 41) Gadsby, D. C., Kimura, J. & Noma, A. (1985) Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* **315**, 63-65.
 - 42) Gadsby, D. C. & Nakao, M. (1989) Steady-state current-voltage relationship of the Na/K pump in guinea pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **94**, 511-537.
 - 43) Gillis, K. D., Pun, R. Y. K. & Misler, S. (1991) Single cell assay of exocytosis from adrenal chromaffin cells using "perforated patch recording". *Pflugers Arch.* **418**, 611-613.
 - 44) Gola, M. & Crest, M. (1993) Colocalization of active KCa channels and Ca^{2+} channels within Ca^{2+} domains in Helix neurons. *Neuron* **10**, 689-699.
 - 45) Gonoi, T. & Hille, B. (1987) Gating of Na channels. Inactivation modifiers discriminate among models. *J. Gen. Physiol.* **89**, 253-274.
 - 46) Gottmann, K., Roher, H. & Lux, H. D. (1991) Distribution of Ca^{2+} and Na^+ conductances during neuronal differentiation of chick DRG precursor cells. *J. Neurosci.* **11**, 3371-3378.
 - 47) Grantyn, R., Kraszewski, K., Richthof, S. & Kettenmann, H. (1993) The nystatin method of whole-cell patch clamp recording. in "Practical Electrophysiological Methods" eds, H. Kettenmann & R. Grantyn, Wiley-Liss, New York, pp. 274-278.
 - 48) Grinnell, A. D., Gundersen, C. B., Meriney, S. D. & Young, S. H. (1989) Direct measurement of ACh release from exposed frog nerve terminals, constraints on interpretation of non-quantal release. *J. Physiol. Lond.* **419**, 225-251.
 - 49) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* **391**, 85-100, 1981.
 - 50) Hamill, O. P. & Sakmann, B. (1981) Multiple conductance states of single acetylcholine receptor channels in embryonic muscle cells. *Nature* **294**, 462-464.
 - 51) Hamill, O. P., Bormann, J. & Sakmann, B. (1983) Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* **305**, 805-808.
 - 52) Haydon, P. G. & Man-Son-Hing, H. (1988) Low- and high-voltage-activated calcium currents, their relationship to the site of neurotransmitter release in an identified neuron of Helisoma. *Neuron* **1**, 919-927.
 - 53) Heidelberger, R. & Matthews, G. (1992) Calcium influx and calcium current in single synaptic terminals of goldfish retinal bipolar neurons. *J. Physiol. Lond.* **447**, 235-256.
 - 54) Hescheler, J. & Trautwein, W. (1988) Modification of L-type calcium current by intracellularly applied trypsin in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol. Lond.* **404**, 259-274.
 - 55) Hille, B. (1984) "Ionic channels of excitable membranes", Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - 56) Hille, B. (1992) "Ionic channels of excitable membranes, second edition", Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - 57) Holz, R. & Finkelstein, A. (1970) The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56**, 125-145.
 - 58) Horn, R. & Korn, S. J. (1992) Prevention of rundown in electrophysiological recording. *Methods Enzymol.* **207**, 149-155.
 - 59) Horn, R. & Marty, A. (1988) Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J. Gen. Physiol.* **92**, 145-159.
 - 60) Howe, J. R., Colquhoun, D. & Cull-Candy, S. G. (1988) On the kinetics of large-conductance glutamate-receptor ion channels in rat cerebellar granule neurons. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **233**, 407-422.
 - 61) Hume, R. I., Role, L. W. & Fishbach, G. D. (1983) Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. *Nature* **305**, 632-634.
 - 62) Ifune, C. K. & Steinbach, J. H. (1990) Rectification of acetylcholine-elicited currents in PC12 pheochromocytoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 4794-4798.
 - 63) Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. & White, T. J. eds., "PCR Protocols, A Guide to

- Methods and Applications" Academic Press, San Diego, California, 1990.
- 64) Jackson, M. B. (1992) Cable analysis with the whole-cell patch clamp, theory and experiment. *Biophys. J.* **61**, 756-766.
 - 65) Jackson, M. B. (1993) Passive current flow and morphology in the terminal arborizations of the posterior pituitary. *J. Neurophysiol.* **69**, 692-702.
 - 66) Jahr, C. E. & Stevens, C. F. (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* **325**, 522-525.
 - 67) Kameyama, M., Hescheler, J., Hofmann, F. & Trautwein, W. (1986) Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in the guinea pig heart. *Pflugers Arch.* **407**, 123-128.
 - 68) Kataoka, Y. & Ohmori, H. (1994) Activation of glutamate receptors in response to membrane depolarization of hair cells isolated from chick cochlea. *J. Physiol. Lond.* **477**, 403-414.
 - 69) Korn, S. J., Marty, A., Connor, J. A. & Horn, R. (1991) Perforated patch recording. in "Methods in Neuroscience, Vol 4" ed., P. M. Conn., Academic Press, San Diego, California, pp. 364-373.
 - 70) Kostyuk, P. G., Krishtal, O. A. & Pidoplichko, V. I. (1981) Calcium inward current and related charge movements in the membrane of snail neurons. *J. Physiol. Lond.* **310**, 403-421.
 - 71) Kramer, R. H. (1990) Patch clamping, monitoring intracellular messengers in intact cells with membrane patches containing detector ion channels. *Neuron* **4**, 335-341.
 - 72) Kuba, K. & Nishi, S. (1979) Characteristics of fast excitatory postsynaptic current in bullfrog sympathetic ganglion cell. Effects of membrane potential, temperature and Ca ions. *Pflugers Arch.* **378**, 205-212.
 - 73) Lagnado, L., Carvetto, L. & McNaughton, P. A. (1988) Ion transport by the Na-Ca exchange in isolated rod outer segment. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **85**, 4548-4552.
 - 74) Lagnado, L. & McNaughton, P. A. (1990) Electrogenic properties of the Na:Ca exchange. *J. Membrane Biol.* **113**, 177-191.
 - 75) Lambolez, B., Audinat, E., Bochet, P., Crépel, F. & Rossier, J. (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* **9**, 247-258.
 - 76) Lancaster, B. & Nicoll, R. A. (1978) Properties of two calcium-activated hyperpolarizations in rat hippocampal neurones. *J. Physiol. Lond.* **389**, 187-203.
 - 77) Lee, K. S., Akaike, N. & Brown, A. M. (1978) Properties of internally perfused voltage-clamped isolated nerve cell bodies. *J. Gen. Physiol.* **71**, 489-507.
 - 78) Lemos, J. R., Nordmann, J. J., Cooke, I. M. & Stuenkel, E. L. (1986) Single channels and ionic currents in peptidergic nerve terminals. *Nature* **319**, 410-412.
 - 79) Lemos, J. R. & Nowicky, M. C. (1989) Two types of calcium channels coexist in peptide-releasing vertebrate nerve terminals. *Neuron* **2**, 1419-1426.
 - 80) Levitan, E. S. & Kramer, R. H. (1990) Neuropeptide modulation of single calcium and potassium channels detected with a new patch clamp configuration. *Nature* **348**, 545-547.
 - 81) Lindau, M. & Fernandez, J. M. (1986) IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* **319**, 150-153.
 - 82) Lipscombe, D. & Rang, H. P. (1988) Nicotinic receptors of frog ganglia resemble pharmacologically those of skeletal muscle. *J. Neurosci.* **8**, 3258-3265.
 - 83) Llano, I., Marty, A., Armstrong, C. M. & Konnerth, A. (1991) Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of purkinje cells in rat cerebellar slices. *J. Physiol. Lond.* **434**, 183-213.
 - 84) Magleby, K. L. & Stevens, C. F. (1972) The effect of voltage on the time course of end-plate currents. *J. Physiol. Lond.* **223**, 151-171.
 - 85) Major, G., Evans, J. D. & Jack, J. B. (1993) Solutions for transients in arbitrarily branching cables. I. voltage recording with a somatic shunt. *Biophys. J.* **65**, 423-449.
 - 86) Malecot, C. O., Feindt, P. & Trautwein, W. (1988) Intracellular N-methyl-D-glucamine modifies the kinetics and voltage-dependence of the calcium current in guinea pig ventricular heart cells. *Pflugers Arch.* **411**, 235-242.
 - 87) Manabe, T., Renner, P. & Nicoll, R. A. (1992) Postsynaptic contribution to long-term potentiation revealed by the analysis of miniature synaptic currents. *Nature* **355**, 50-55.
 - 88) Man-Son-Hing, H. & Haydon, P. G. (1992) Modulation of growth cone calcium current is mediated by a PTX-sensitive G protein. *Neurosci. Lett.* **137**, 133-136.
 - 89) Marty, A. & Finkelstein, A. (1975) Pores formed in lipid bilayer membranes by nystatin. Differences in its one-sided and two-sided action. *J. Gen. Physiol.* **65**, 515-526.
 - 90) Marty, A. & Neher, E. (1983) Tight-seal whole-cell recording. in "Single-channel recording", eds. B. Sakmann & E. Neher, Plenum, New York, NY, USA, pp. 107-122.
 - 91) Mathie, A., Colquhoun, D. & Cull-Candy, S. G. (1990) Rectification of currents activated by nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic ganglion neurones. *J. Physiol. Lond.* **427**, 625-655.
 - 92) Nakao, M. & Gadsby, D. C. (1989) [Na] and [K] dependence of the Na/K pump current-voltage

- relationship in guinea pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* **94**, 539-565.
- 93) Neher, E. (1988) The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. *J. Physiol. Lond.* **395**, 193-214.
 - 94) Neher, E. (1992) Correction for liquid junction potentials in patch clamp experiments. *Methods enzymol.* **207**, 123-131.
 - 95) Neher, E. & Augustine, G. J. (1992) Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *J. Physiol. Lond.* **450**, 273-301.
 - 96) Neher, E. & Marty, A. (1982) Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **79**, 6712-6716.
 - 97) Neher, E. & Sakmann, B. (1975) Voltage-dependence of drug-induced conductance in frog neuromuscular junction. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **72**, 2140-2144.
 - 98) Nicholls, J. G., Martin, A. R. & Wallace, B. G. (1992) "From neuron to brain, third edition", Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
 - 99) Nicholls, D. & Attwell, D. (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 462-468.
 - 100) Niggli, E. & Lederer, W. J. (1991) Molecular operations of the sodium-calcium exchanger revealed by conformation currents. *Nature* **349**, 621-624.
 - 101) Oxford, G. S., Wu, C. H. & Narahashi, T. (1978) Removal of sodium channel inactivation in squid axons by N-bromoacetamide. *J. Gen. Physiol.* **71**, 227-247.
 - 102) Plummer, M. R. & Hess, P. (1991) Reversible uncoupling of inactivation in N-type calcium channels. *Nature* **351**, 657-659.
 - 103) Plummer, M. R., Logothetis, D. E. & Hess, P. (1989) Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**, 1453-1463.
 - 104) Purves, D., Hadley, R. D. & Voyvodic, J. T. (1986) Dynamic changes in the dendritic geometry of individual neurons visualized over periods of up to three months in the superior cervical ganglion of living mice. *J. Neurosci.* **6**, 1051-1060.
 - 105) Purves, D., Voyvodic, J. T., Magrassi, L. & Yawo, H. (1987) Nerve terminal remodeling visualized in living mice by repeated examination of the same neuron. *Science* **238**, 1122-1126.
 - 106) Rae, J., Cooper, K., Gates, P. & Watsky, M. (1991) Low access resistance perforated patch recordings using amphotericin B. *J. Neurosci. Meth.* **37**, 15-26.
 - 107) Rang, H. P. (1981) The characteristics of synaptic currents and responses to acetylcholine of rat submandibular ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* **311**, 23-55.
 - 108) Reeves, J. P. & Hale, C. C. (1984) The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange. *J. Biol. Chem.* **259**, 7733-7739.
 - 109) Regan, L. J. (1991) Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis. *J. Neurosci.* **11**, 2259-2269.
 - 110) Roberts, W. M. (1993) Spatial calcium buffering in saccular hair cells. *Nature* **363**, 74-76.
 - 111) Roberts, W. M., Jacobs, R. A. & Hudspeth, A. J. (1990) Colocalization of ion channels involved in frequency selectivity and synaptic transmission at presynaptic active zones of hair cells. *J. Neurosci.* **10**, 3664-3684.
 - 112) Robitaille, R., Garcia, M. L., Kaczorowski, G. J. & Charlton, M. P. (1993) Functional colocalization of calcium and calcium-gated potassium channels in control of transmitter release. *Neuron* **11**, 645-655.
 - 113) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
 - 114) Schwartz, E. A. & Tachibana, M. (1990) Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina. *J. Physiol. Lond.* **426**, 43-80.
 - 115) Sherman-Gold, R. ed. "The Axon guide", Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA, 1993.
 - 116) Shuba, Y. M., Hesslinger, B., Trautwein, W., McDonald, T. F. & Pelzer, D. (1990) Whole-cell calcium current in guinea-pig ventricular myocytes dialysed with guanine nucleotides. *J. Physiol. Lond.* **424**, 205-228.
 - 117) Smith, S. M., Zorec, R. & McBurney, R. N. (1989) Conductance states activated by glycine and GABA in rat cultured spinal neurones. *J. Membr. Biol.* **108**, 45-52.
 - 118) Spruce, A. E., Breckenridge, L. J., Lee, A. K. & Almers, W. (1990) Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron* **4**, 643-654.
 - 119) Stanley, E. F. (1989) Calcium currents in a vertebrate presynaptic nerve terminal, the chick ciliary ganglion calyx. *Brain Res.* **505**, 341-345.
 - 120) Streit, J. & Lux, H. D. (1989) Distribution of calcium currents in sprouting PC-12 cells. *J. Neurosci.* **9**, 4190-4199.
 - 121) Stuart, G. J., Dodt, H.-U. & Sakmann, B. (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared

- video microscopy. *Pflügers Arch.* **423**, 511-518.
- 122) Stuart, G. J. & Sakmann, B. (1994) Active propagation of somatic action potentials into neocortical pyramidal cell dendrites. *Nature* **367**, 69-72.
 - 123) Swandulla, D. & Armstrong, C. M. (1988) Fast-deactivation calcium channels in chick sensory neurons. *J. Gen. Physiol.* **92**, 197-218.
 - 124) Szatkowski, M., Barbour, B. & Attwell, D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* **348**, 443-446.
 - 125) Tachibana, M. & Okada, T. (1991) Release of endogenous excitatory amino acids from ON-type bipolar cells isolated from the goldfish retina. *J. Neurosci.* **11**, 2199-2208.
 - 126) Tachibana, M., Okada, T., Arimura, T., Kobayashi, K. & Piccolino, M. (1993) Dihydropyridine-sensitive calcium current mediates neurotransmitter release from bipolar cells of the goldfish retina. *J. Neurosci.* **13**, 2898-2909.
 - 127) Takahashi, K. & Yoshii, M. (1978) Effects of internal free calcium upon the sodium and calcium channels in the tunicate egg analyzed by the internal perfusion technique. *J. Physiol. Lond.* **279**, 519-549.
 - 128) Takahashi, T. & Momiyama, A. (1991) Single-channel currents underlying glycinergic inhibitory postsynaptic responses in spinal neurons. *Neuron* **7**, 965-969.
 - 129) Thomas, P., Surprenant, A. & Almers, W. (1990) Cytosolic Ca^{2+} , exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. *Neuron* **5**, 723-733.
 - 130) Thorn, P. J., Wang, X. & Lemos, J. R. (1991) A fast, transient K^{+} current in neurohypophyseal nerve terminals of the rat. *J. Physiol. Lond.* **432**, 313-326.
 - 131) VanGelder, R., VanZastrow, M., Yool, A., Dement, W., Barchas, J. & Eberwine, J. (1990) Amplified RNA (aRNA) synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 1663-1667.
 - 132) Vassilev, P. M., Scheuer, T. & Catterall, W. A. (1988) Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**, 1658-1661.
 - 133) Wang, G. K., Brodwick, M. S. & Eaton, D. C. (1985) Removal of Na channel inactivation in squid axon by an oxidant chloramine-T. *J. Gen. Physiol.* **86**, 289-302.
 - 134) Yawo, H. (1989) Rectification of synaptic and acetylcholine currents in the mouse submandibular ganglion cells. *J. Physiol. Lond.* **417**, 307-322.
 - 135) Yawo, H. & Chuhma, N. (1993) An improved method for perforated patch recordings using nystatin-fluorescein mixture. *Jpn. J. Physiol.* **43**, 267-273.
 - 136) Yawo, H. & Momiyama, A. (1993) Re-evaluation of calcium currents in pre- and postsynaptic neurones of the chick ciliary ganglion. *J. Physiol. Lond.* **460**, 153-172.
 - 137) Young, S. H. & Poo, M.-M. (1983) Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. *Nature* **305**, 634-637.