

イオンチャネル研究のための脂質平面膜法

老 木 成 稔

(生理学研究所 機能協関部門)

目 次

I. はじめに	193
II. 脂質平面膜法	194
A. 脂質平面膜形成法	194
(1) チェンバー	
1. 1 穴の作り方	
1. 2 チェンバーの組み立て	
(2) 平面膜形成法	
2. 1 リン脂質溶液	
2. 2 ベインティング法	
2. 3 張り合わせ法	
2. 4 クリーンな系の確立	
B. 平面膜の物理化学	199
(1) 平面膜の構造と形成	
(2) 静電膜容量	
(3) 溶媒含有膜と無溶媒膜	
(4) 脂質組成	
C. 膜蛋白組込み法	201
(1) 膜融合	
1. 1 膜融合法	
1. 2 融合の停止	
1. 3 膜融合機序	
(2) ナイスタチン法	
(3) 直接挿入法	
(4) 単層展開法	
D. 平面膜系のエレクトロニクス	208
(1) バックグラウンド電流ノイズの最小化	
1. 1 入力電位ノイズ	
1. 2 アクセス抵抗熱電位ノイズ	
1. 3 ノイズの評価	
(2) 容量性フィードバック	
E. 高解像度記録法	210
(1) ティップ=ディップ法	
1. 1 張り合わせティップ=ディップ法	
1. 2 改良ティップ=ディップ法	
1. 3 張り合わせティップ=ディップ法 と改良ティップ=ディップ法	
(2) 削り取り小孔法	
(3) パンチアウト法	
III. チャネル電流記録	214
A. 細胞小器官のチャネル	214
(1) 過渡的単一チャネル電流記録	
(2) Translocon	
B. ニコチン性アセチルコリン受容体	216
C. チャネルデザイン	217
D. オープンチャネルノイズ	219
IV. 今後の展望	219

I. はじめに

イオンチャネル研究のために脂質平面膜法を適用する目的は大きく2つに分けられる。通常のパッチクランプ法ではアクセスが困難なチャネルを対象とすると、もう一つはチャネルの構造機能相関研究を深めるために単純な再構成系で実験を行う必要がある場合である。

いわゆる inaccessible チャネルとは、細胞小器官上のチャネルはもとより、細胞膜上でも解剖学的にパッチクランプが困難な場所にあるものを指す。シナプス前膜などの微小な構造物、極性を持った細胞の特定の膜、などである。また高抵抗のシールが得られないような膜上のチャネル、例えば刷子縁膜上のチャネルや、電気器官上のニコチン性アセチルコリン受容体のようにチャネル密度が高すぎるものは広義の inaccessible チャネルの範疇にはいる。後者については標本の選択や手技上の改善によってパッチクランプが不可能ではないのに対し、細胞小器官上のチャネルは何らかの生化学的操作をとおしてはじめて平面膜による電気生理学的対象となる。細胞内の反応を細胞の表面から眺めているだけでなく、細胞内コンパートメントの間で起こっている現象を直接捉えることによって、細胞小器官の電気生理学という視点から細胞機能が新しく見えてくるであろう。

イオンチャネルの基本的な機構や詳細な構造機能相関を研究するためにはチャネル分子そのものの性質、分子機構をできるだけ単純でコントロールされた系で解析する必要がある。脂質平面膜法では膜脂質の組成も変えられるので、チャネルを化学的に明確に限定された系に再構成できる。究極的には水、塩類、リン脂質、チャ

ネルという純粋な系が実現する。また、いったんチャネルが膜に組み込まれて活性を示せば、その後の実験条件を選ばない。高いイオン濃度、膜電位などの条件下で、通常見えないような小さなコンダクタンスのチャネルを捉えることも可能である。特に、膜脂質の組成を変えることによって、膜の流動性や表面電荷などの物理化学的なチャネルに対する影響だけでなく、チャネルと他の膜内分子との直接的な相互作用など、パッチクランプ法という複雑な系では研究が困難な領域に踏み込むことができる。

平面膜法の最大の欠点はその低分解能にあると最近までいわれてきた。平面膜の直径が通常100 μm のオーダーであるため膜容量による電流雑音が大きく、また電位ステップに対する応答特性が悪いので、過渡的応答が捉えられない。しかし、最近技術的に目覚ましい2つの進展があった。ひとつは、ティップ=ディップ法などの低膜容量(小面積)の平面膜を使った方法である。従来からのパンチアウト法、ティップ=ディップ法に加え、より安定な改良ティップ=ディップ法、チェンバーに小孔を作る方法(小孔法)が確立してきた。この方法によって電位依存性に速い活性化過程を示すチャネルの記録も可能になっている。新しいティップ=ディップ法は単一チャネル記録法として最高の周波数帯域をもつ。

もうひとつの進歩は、平面膜へチャネルを組み込むための膜融合過程を可視化できるようになったことである。小さな面積の膜に対する膜融合の効率を高め、しかもその過程をリアルタイムでモニターできる。

これらの進歩を含めた現代の脂質平面膜法を紹介したい。本総説の構成は前半(Cまで)に平面膜法の基本的な手技と原理を記述した。具体的な手順を述べた項目は下線で示した。ここまでの知識で平面膜法をとりあえず始めることができる。Dで系を改善するための指針としての原理を示し、Eで高解像度記録法を記述した。これらの方法を使った具体例をⅢに示した。なお平面膜法によるイオンチャネル研究の成果に

については他の総説を参照されたい^{39,45,50}。

Ⅱ. 脂質平面膜法

A. 脂質平面膜形成法

平面脂質二重膜を形成するにはペインティング法と張り合わせ法という2つの方法がある。この2つの方法はすべての基本となるものである。テフロンなどの疎水性物質で作った2つのコンパートメントからなるチェンバーに数 ml 以下の塩溶液を満たし、コンパートメント間に直径数10 μm から数100 μm の平面膜を再現性よく形成できる。ペインティング法と張り合わせ法に共通なチェンバーの作り方からはじめよう。

(1) チェンバー

私達の方法では穴を開けた隔壁をテフロンチェンバーの間に挟みこむ。平面膜の張りやすさと安定性に最も重要なのは素材と穴の形状である。

1.1 穴の作り方

穴の作り方のうち削り取り法⁹⁰を詳しく記述する(図1)。

- ①培養ディッシュの蓋(3.5cm 培養ディッシュ; 厚さ約1mm)から適当な大きさ(約1cm×1cm)のポリスチレン板を切り出す。
- ②ステンレス棒(直径3mmのステンレス棒の先端を開口角が90°になるように円錐形に削り、その後、表面ができるだけ平滑になるように磨く。ごく先端までシャープでなければならぬ⁹⁰)をガスバーナ(細い炎に絞れるもの: PRINCE ピエゾガスバーナ GB-2001)であたためる。ただし、最少限に留める。
- ③ステンレス棒をポリスチレン板に押し付け、他側にわずかにふくらみができるところまで進める。ゆっくり押し込まれていくような低い温度でないとポリスチレンの変形が穴の外の広い範囲に広がってしまう。
- ④ポリスチレンが冷えて固まるまでステンレス棒を押し込んだ位置で待つ。
- ⑤ステンレス棒をはずす。表面が平滑な円錐状の穴ができる。

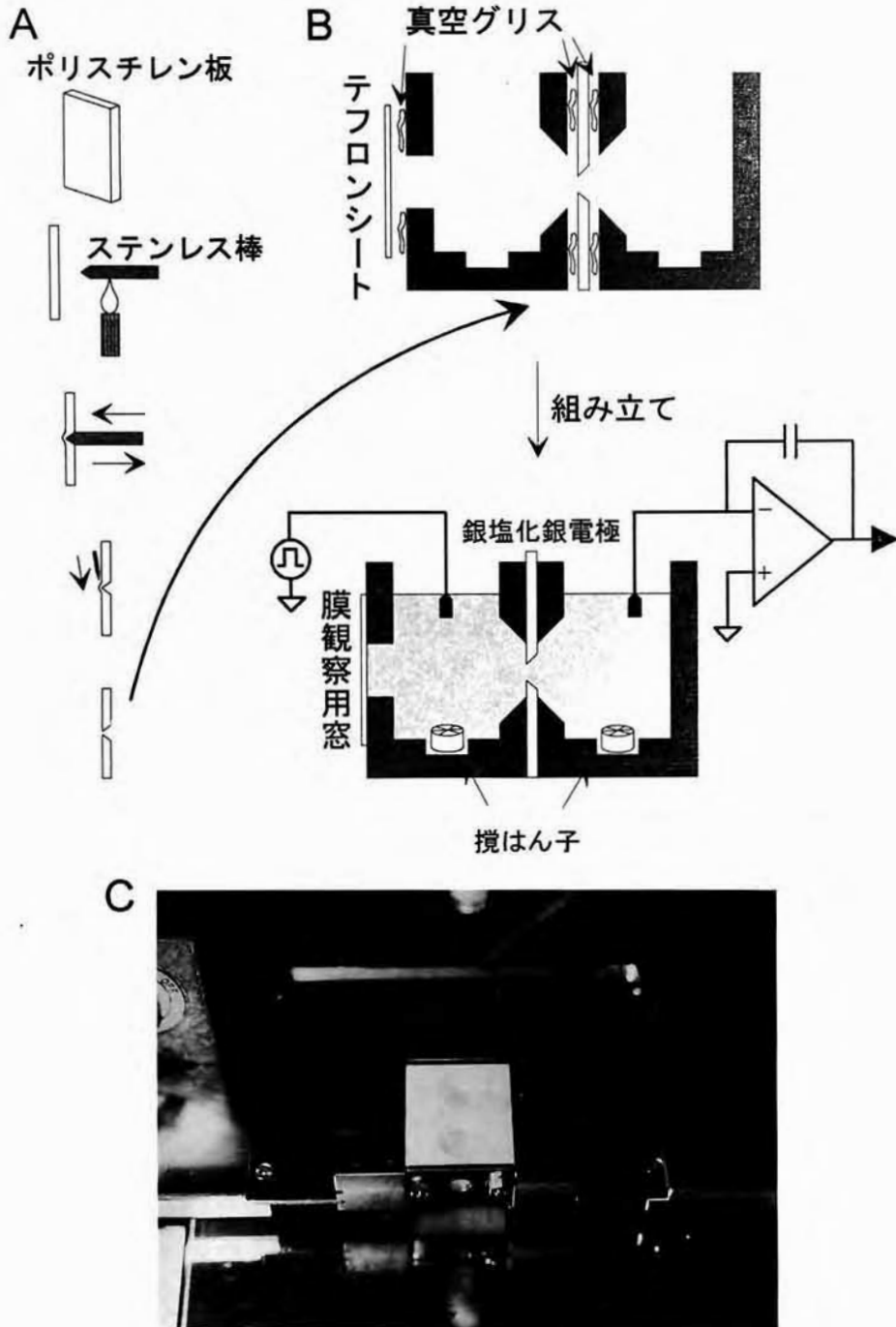


図1 平面膜チャンバーの組み立て

A. ポリスチレン隔壁への穴の作り方. B. 隔壁のテフロンチャンバーへの挟みこみ. C. ファラディボックス内の真鍮ブロックにセットされたチャンバー. 真鍮ブロックはステンレス板に固定してある. 熱伝導の低いステンレスによって熱の放散を妨げる.

- ⑥他側の膨らみを剃刀で切り取る。この時の加減で直径 $30\ \mu\text{m}$ から数 $100\ \mu\text{m}$ まで自由な大きさのものを作ることができる。穴の形状は真円でなければならない。穴のエッジは極めてシャープである。直径を記録しておく。
- ⑦水、エタノールで洗い、乾燥させる。

「削り取り法」は後述するペインティング法、張り合わせ法、小孔法、すべてに適用できる。この「削り取り法」の特徴は穴と隔壁に対する以下の要件を満たしていることである。i) 小浮遊容量, ii) 小アクセス抵抗, iii) 膜の安定性, iv) 少誘電損失。隔壁が薄すぎると浮遊容量が大きくなってしまふ。この方法による浮遊容量は $5\ \text{pF}$ 以下である。一方厚すぎると穴の長さの分、アクセス抵抗(平面膜と直列に存在する溶液と電極の抵抗)が高くなる。2つの点を解決したのがこの穴で、隔壁が厚いため機械的強度が大きく、開口角度が大きいためアクセス抵抗が小さい。従って非攪はん層が小さく、ベシクルが平面膜表面に接近しやすい。さらにエッジがシャープであるため薄膜化を促進し、膜が安定である。隔壁はその素材がポリスチレンやテフロンのような誘電損失の少ないものが望ましい。ただし、ポリスチレンの場合1日以上使うとエッジにひびがはいることがある。隔壁を毎日取り替えることによって常に清潔な実験が行える。

1.2 チェンバーの組み立て

- ①チェンバーのデザイン⁴⁸⁾(図1B)：隔壁以外の素材はテフロンである。
- ②テフロンチェンバーのポリスチレン隔壁が当たる所に真空グリース(シリコングリース、ダウコーニング)を適量塗る。電気的なリークがないように注意する。膜観察用窓の周囲にも真空グリースを塗る。
- ③ポリスチレン隔壁をチェンバーに挟みこみ、テフロンシート片(厚さ $25\ \mu\text{m}$, YSI Membrane Kit, YSI Inc. Ohio)を窓に張り付ける。チェンバーはねじで固定する。チェンバーの

容量は $1.2\ \text{ml}$ である。

- ④組み立てたチェンバーをファラデイボックス内に固定する(図1C)。温度コントロールされた真鍮ブロックにおさめる。
- ⑤実験途中でチェンバーを洗う必要のあるときは水、エタノールで行う(クロロホルム/メタノールを使うとポリスチレン隔壁が溶けてしまう)。

(2) 平面膜形成法

2.1 リン脂質溶液

膜形成用として、脂質を有機溶媒(アルカン[飽和炭化水素:デカン, ヘキサデカン, ヘキサンなど]を使うことが多い)に分散したもの(脂質溶液)を使う。リン脂質濃度は通常 $4\sim 40\ \text{mg/ml}$ である。

目的によって純粋なリン脂質を使う場合と混合リン脂質を使う場合がある。単一の分子種を

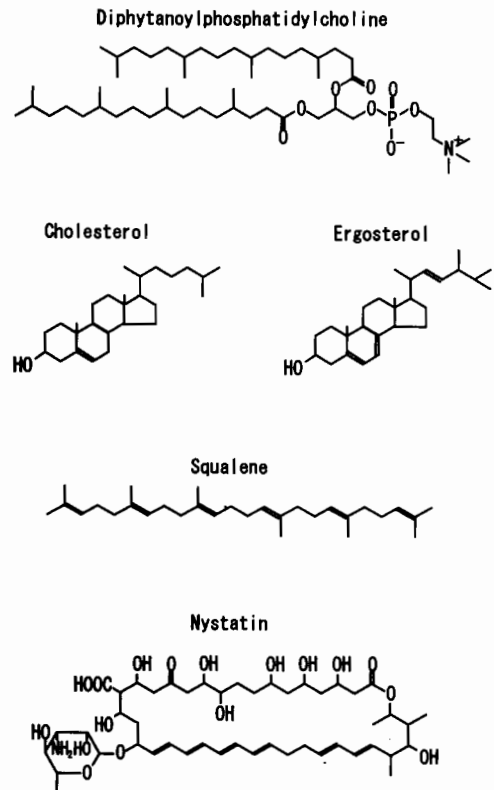


図2 平面膜に使用する分子の構造

使った方が実験の解釈が容易である。事実平面膜ではジフィタノイルホスファチジルコリンとグリセロールモノオレエイトのいずれかを使ったデータが蓄積している¹⁾。ジフィタノイルホスファチジルコリン(DΦPC, 分子量: 846.26, 図2)は分岐した飽和アシル基をもつ。全合成されたもので純度が高く化学的に安定である⁶⁵⁾。

膜に正味の表面陰電荷をもたせるためにホスファチジルセリン(PS)を加えた混合物を使うことも多い(例えばPC:PS=1:1, PE:PS=1:1)。一方, 特定のチャネル(例えばニコチン性アセチルコリン受容体)はチャネル活性維持のためにリン脂質だけでなくコレステロールを必要とする⁴⁸⁾。アソレクチンは大豆抽出物でPCを始め生体膜のすべての脂質成分を含む。

2.2 ペインティング法

リン脂質溶液を疎水性担体の穴に塗布すると, 有機溶媒が2枚の単分子層の間から排除され脂質二重層を形成する⁵¹⁾。ペインティング法の場合, 有機溶媒は通常デカンを使う。リン脂質溶液を穴に塗布する際に筆を使っていたことからペインティング法と呼ばれるが, 私達は泡吹き付け法を使っている。

- ①凍結保存したリン脂質溶液のクロロホルムを窒素ガスで完全に気化し乾固したあと, デカンを加える(20 mg/ml)。
- ②プレコーティング: 穴のまわりに両側から少量(2 μl)のリン脂質溶液を塗布し, 窒素ガス流下で乾燥させる。
- ③溶液をチェンバーに満す。攪はん子の付近に気泡があるとスムーズに回転しないので取り除いておく。
- ④各コンパートメントを銀塩化銀電極(銀塩化銀合金, In Vivo Metric, US)あるいは塩橋を介してアンプに接続する。電位バランスをとる。
- ⑤清潔なパストツールピペット(隔壁の穴に傷をつけないため, 新しいパストツールピペットの

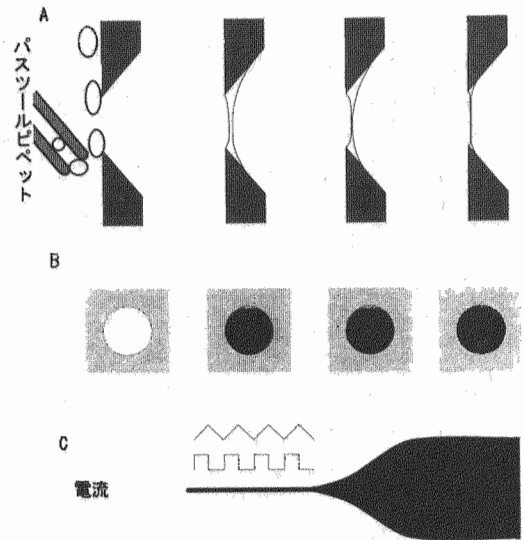


図3 ペインティング法(泡吹き付け法)による膜形成過程。

A. 穴の断面図。B. 穴の正面図。膜面からの反射光を実体顕微鏡で観察すると膜形成過程は, i) リン脂質溶液を塗布した直後, 虹色の膜(グラジエント)がみえる。ii) 下部に黒い楕円の領域ができこれが全体に広がる。iii) まわりのドーナツ状の環状バルク相が虹色に見えその中に黒い円形の二重層がみえる。境界部は明瞭である。C. ランプ波電位に対する電流応答と膜形成に対応した時間経過。

先端をガスバーナで熱し, ヒートポリッシュする。(クロロホルム/メタノール(1:1)で洗浄する。)にごく少量(10 μl 以下)のリン脂質溶液を付け, 孔の下に先端を持っていき, 先端からの泡が孔を覆うようにして通過するようにゆっくり吹き出す(図3 A)。

- ⑥ランプ電位を負荷し, 膜容量を経時的にモニターする。i) 抵抗の増大でリン脂質溶液が穴を塞いだことがわかり, ii) 膜容量増大で薄膜化が進んでいることが確認できる。容量は速やかに増大し, 飽和レベルに達する(図3 C)。膜の薄膜化は光学的に黒膜化として観察できる。(25~50 Åの厚さの二重膜は周囲の厚い部分[環状バルク相]に比べ光をほとんど反射しないので黒く見える。図3 B)
- ⑦孔に比して小さな面積の黒膜しか形成されないことがあるが, 何度か破って張るうちに黒膜の占める割合が次第に大きくなって安定な

膜となる。

- ⑧大量のリン脂質溶液が塗布された場合は薄膜化が進まないことがある。その場合、泡を強く吹き付け膜を破る。この形状の孔を使う限り薄膜化が始まるのも、黒膜の面積が安定するまでの時間も速やかである。膜電位の印加は薄膜化を促進する。
- ⑨膜抵抗と膜容量をチェックする。膜抵抗は100 GΩ以上。黒膜の直径と膜容量から特性膜容量が計算できる。溶媒がデカンするとき特性膜容量は $0.3\sim 0.6 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ である。薄膜化したものが再び厚くなることもあるから膜容量が安定していることを確かめる。

例) 穴の直径が200 μmで2重層の直径が160 μmと読み取れたとする。特性膜容量が $0.5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ のとき膜容量は100 pFである。

2.3 張り合わせ法

張り合わせ法はLangmuir-Blodgett法という単分子層形成技術を平面膜形成のために応用したものである。気-液界面に形成された単分子層を穴をあけた疎水性担体の両側に2枚対称させて、有機溶媒を含まない二分子膜(無溶媒膜)を形成することが当初のアイデアであった^{31,47,84)}。ペインティング法にない利点は非対称組成の膜が形成できることである。リン脂質分子の膜内フリップ=フロップ速度は極めて遅いので非対称性は長時間維持される⁷²⁾。

Langmuir-Blodgett法⁹³⁾ 水溶液の上にリン脂質溶液を加え放置すると揮発性の高い有機溶媒(ヘキサンなど)が気化し、気-液界面に単分子層が形成される。単分子層に表面張力を負荷した状態で固体の担体(親水性あるいは疎水性)が気-液界面を通過すると、単分子層は配向をそろえたまま担体の表面に移行する。気-液界面を何回か上下させることによって単分子層は向きをそろえて表面に重畳する。

- ①プレコート: 疎水性の高いスクアレンを有機溶媒(ヘキサン)で希釈し、穴の両側からプレコートする。
- ②塩溶液をチェンバー両側の穴の下のレベルまで満たし、銀塩化銀電極あるいは塩橋を介し

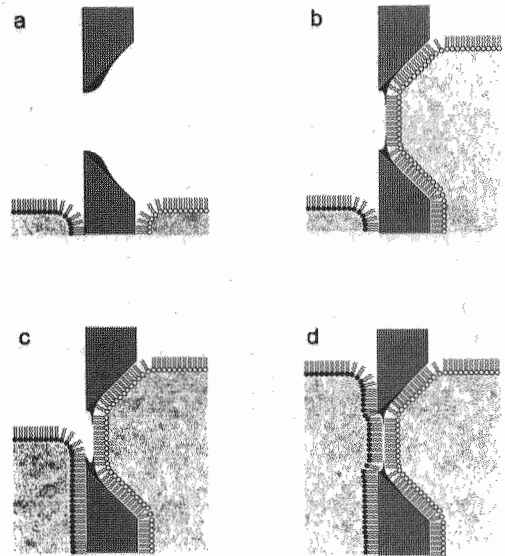


図4 張り合わせ法

a. 気-液界面には両側で異なる種類の脂質が単分子層を形成している。プレコートしたスクアレン(黒色で示す)は穴の付近にひろがっている。b. チェンバーの一方に緩衝液を加えて行き、液面が穴を通過するようにする。スクアレンがあるため一方の単分子膜が穴を越えて他側にひろがらない。c. 他方の液面も上げる。d. 非対称二重層の形成。スクアレンが環状バルク相を形成する。

アンプに接続する。

- ③リン脂質溶液(4 mg/ml ヘキサン)を両側に50 μl 加える。リン脂質溶液の方が水溶液より比重が小さいので表面に分布する。
- ④数分間放置。溶媒が気化して気-液界面に単分子層が形成される(図4 a)。
- ⑤ランプ電位を負荷し、膜容量を経時的にモニターする。
- ⑥チェンバーの両側に溶液を加え水位を上げ、穴を通過させる(図4 b-d)。膜がただちに形成されるのが電気容量の経時変化として捉えられる。
- ⑦膜が形成されないときは液面の上下を何度か繰り返す。

張り合わせ法で形成されるいわゆる無溶媒膜では特性膜容量が $0.6\sim 0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ であり、ペインティング法で形成される溶媒含有膜(0.3

~0.6 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$) に比べ薄い。

2.4 クリーンな系の確立

平面膜は界面活性剤を嫌う。両親媒性の界面活性剤が膜を攪乱するからである。ひとたび界面活性剤を使うと取り除くのは容易ではないので⁶⁷⁾、界面活性剤を含まない系を確立することが必要である。器具洗浄法は強酸とクロロホルム/メタノールでおこなう。私達の基本的な方針は、「できる限り器具はディスプレイに、それ以外は化学的に安定なテフロンやガラスで作られ強力に洗浄」である。クリーンにすればするほど膜は安定になる。以下のような系では膜は高電圧にも耐えられ極めて安定である。

器具洗浄法

- ①テフロンチェンバーの真空グリスをティッシュペーパーで拭う。
- ②テフロンチェンバー、ガラス器具などを流水下で洗浄(塩を除く)。
- ③強酸(濃硝酸:濃硫酸=1:3)中に2, 3日放置。
- ④流水で4時間水洗後, 2回蒸留水で数回洗う。
- ⑤乾燥。
- ⑥クロロホルム:メタノール(2:1, v/v)中で超音波洗浄15分。
- ⑦乾燥。

リン脂質

高純度(99%)リン脂質が Avanti (Avanti Polar-Lipids, Inc., US) などからクロロホルム溶液として手にはいる。私達はこれをさらに精製して使っている。以下の操作に使用する有機溶媒は高速液体クロマトグラフィー用のものである。脂質の基本的な取り扱いについては「脂質研究法³⁴⁾」を参照のこと。

イオン交換クロマトグラフィーによるリン脂質精製法

この方法による脂質分離の原理は第一義的にはイオン性グループの交換に基づくが、水酸基のような非イオン性グループに基づく極性の差もまた影響をおよぼす。

- ①ジエチルアミノエチル(DEAE)-セルロースを脱気した水酢酸に混和し、一夜放置する。

- ②直径 2 cm のカラムに約 20 cm の高さに充填。
- ③カラムを 3~5 ベッド容のメタノール, クロロホルム:メタノール(1:1), クロロホルムで順次洗浄する。
- ④リン脂質のクロロホルム溶液をカラムに注入。
- ⑤3~5 ベッド容のクロロホルムで洗浄。
- ⑥特定のリン脂質に対応した溶出溶媒で溶出。PC の場合クロロホルム:メタノール(9:1), PE の場合クロロホルム:メタノール(7:3)で溶出。溶出の有無は, i) フィルター紙上に数滴下し, ii) 溶媒を乾燥させる, iii) よう素ガスを満たした密閉容器にいれ, iv) 褐色に変色すること, で確かめる。
- ⑦薄層(TLC Aluminium Sheets, Silica gel 60 F₂₅₄ pre-coated, Merck)クロマトグラフィーで溶出したリン脂質の純度をチェックする。
- ⑧溶出した液を窒素ガスで溶媒気化後, 乾燥重量を計り, クロロホルムを加え, 一定濃度にする。
- ⑨一回使用量をガラスバイアルに分注し, 窒素ガスで満たす。-70℃凍結保存。

塩の精製

有機物の不純物を熱処理で除く。

- ①塩の粉末をろつばに入れ, 電気炉(ADVANTEC KL-160)で500℃, 24時間処理する。
- ②固まった塩を乳鉢で粉末にする。
- ③デシケータに保存する。

B. 平面膜の物理化学

平面膜の物理化学を知ることによって, より再現性の高い, コントロールされた実験を行うことができる。このような知識を基に安定な膜形成や膜融合のための多くの技術が開発されてきた。

(1) 平面膜の構造と形成

平面膜の構造は, 疎水性の材料でできた穴に接した環状のバルク相(リン脂質と大量の有機溶媒からなる)とそれに支えられた脂質二重層からなる(図5)。環状バルク相と脂質二重層は一定の接触角をもち, その境界は光学的にはっきり区別できる⁸⁹⁾。いわゆる脂質二重層とは2枚の単分子膜とそれに挟まれた有機溶媒層を

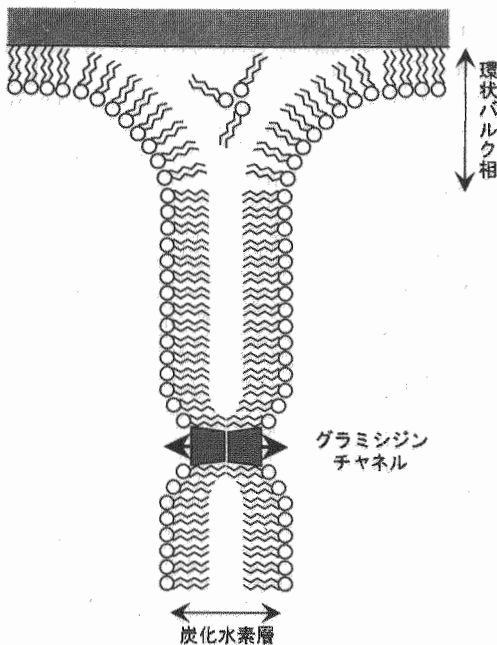


図5 平面膜の各相

環状バルク相(実際にはもっと大きい)には逆ミセルが存在する。グラミシジンチャンネルの形成部位では有機溶媒層が排除されている。

さす。脂質二重層の厚さを規定するものは、i) リン脂質分子のアシル基の長さ、ii) コレステロールの有無(コレステロールを含むと膜は厚くなる¹³⁾)、iii) 有機溶媒層の厚さ(使用する有機溶媒分子が長いほど有機溶媒層は薄い⁸⁹⁾)、の3つである。

パッチクランプでのシール(ガラスピペットと生体膜の接点)に相当するものが環状バルク相である。環状バルク相と二重層の2つの相は化学平衡にある。量的には環状バルク相が圧倒的であるから、これが二重層の安定性と物理化学的性質を規定している。

両親媒性であるリン脂質分子はある濃度以上ではミセルを形成する(臨界ミセル濃度^{81,85)})。この濃度以上でないと二重層は形成されない。ペインティング法において、疎水性担体の穴に塗布した脂質溶液中のリン脂質分子は水との界面で単層に配向する。脂質溶液バルク相の有機溶媒は2枚の単分子層の間から排除され、膜は薄くなる。薄膜化の駆動力は、初期の Plateau-

Gibbs 境界吸引力、中、後期の van der Waals 力である。更に膜が薄くなると単分子層間の立体障害による反発力がバランスし、一定の厚さに落ち着く⁸⁹⁾。わずかに残った有機溶媒相と2枚の単分子層で脂質二重層を形成する。

ペインティング法での薄膜化過程と張り合わせ法での膜形成過程は基本的に同じ原理が働いている。無溶媒膜では、張り合わせ過程で2枚の単分子膜間にスクアレンを取り込み一旦溶媒含有膜となるが(図4C)、ただちにスクアレンが排除され薄膜化することが光学的に観察されている⁵³⁾。形成された膜の物理化学的性質も溶媒含有膜と、いわゆる“無”溶媒膜とは同じである。環状バルク相のない平面膜はあり得ない⁸⁹⁾。

(2) 静電膜容量

脂質平面膜法では膜面積と、必要なら厚さもコントロールできる。平面膜の実験において、膜容量の測定は平面膜の構造と安定性を反映する重要な情報である。電気的に測定した膜容量と光学的に測定した膜面積とから特性膜容量(C_m)が求まる。

$$C_m = C_t / A_m \quad (1)$$

C_t は全容量、 A_m は膜面積である(有機溶媒を含まない2分子膜の特性膜容量は $0.8 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ 、生体膜は $1.0 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ である)。特性膜容量は主に膜の厚さと炭化水素層の誘電率によって決まる、これを幾何学的特性膜容量(C_g)と呼ぶ⁸⁹⁾。

$$C_g = \epsilon_0 \epsilon_{hc} / d_{hc} \quad (2)$$

ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ_{hc} は炭化水素の比誘電率、 d_{hc} は炭化水素層の厚さである。ここで炭化水素層の厚さとはリン脂質分子の炭化水素鎖の長さとは有機溶媒層の厚さを含むものである(図5)。脂質分子アシル基とヘキサデカンなどの炭化水素の動的な振る舞いは同じなので⁸⁸⁾、均一の相として一定の比誘電率 $\epsilon_{hc} = 2$ をとる。

これに加えて、二重層表面の電気二重層

(C_{dl} : Gouy-Chapman-Stern 層⁴¹⁾)も特性膜容量にかかわる。この2つは直列の容量だから C_m は次のようになる。

$$\frac{1}{C_m} = \frac{1}{C_g} + \frac{2}{C_{dl}} \quad (3)$$

C_{dl} も(2)式と同様の式で表現できる。ただし、このとき ϵ_{dl} は電気二重層の比誘電率、 d_{dl} はデバイの長さで、表面電荷密度とイオン強度に依存することはいうまでもない。

特性膜容量は使用した有機溶媒分子によって決まるので、測定した膜容量は膜面積をあらわす。同一の穴を使用しても二重膜の占める割合は一定ではなく、膜容量は変化する。穴の70~80%を二重膜が占めるという状態が安定である。あまりにも容量が小さいのは環状バルク相が大きすぎて二重膜面積が不安定である。穴の面積にくらべて二重膜の面積の方が大きい場合はチェンバー両側の水位が等しくなく、膜が水圧差でふくらんでいると考えられる。これも不安定である。

膜容量は電位に依存して変化する。電位の絶対値が大きいと電縮のため環状バルク相と二重膜相の接触角が変化し、環状バルク相が退縮し二重膜の面積が広がることによる⁸⁹⁾。

$$\Delta F_V = -\frac{\epsilon_0 \epsilon}{2d} V^2 \quad (4)$$

ΔF_V は電位 V による自由エネルギーの変化である。膜容量の電位依存性変化は非線型であり、電位ステップ応答の実験には好ましくない。一過性容量電流の単純な線型サブトラクションができないからである。環状バルク相をできるだけ小さくすること以外に解決の方法はない。

(3) 溶媒含有膜と無溶媒膜

溶媒含有膜と無溶媒膜の間には質的な差があるわけではなく、形成された膜の特性膜容量は使用する有機溶媒に依存する。実際、張り合わせ法ではスクアレンのほかにヘキサデカンもしくはしばしば用いられ、特性膜容量はやや低い値をと

る。

溶媒含有膜と無溶媒膜でチャネル活性に差があるという報告はない³⁸⁾。チャネルを平面膜に組み込む膜融合に関しては無溶媒膜のほうが困難であるのでペインティング法の方が頻繁に使われている。しかし最近になって無溶媒膜で形成できる非対称性膜のチャネル活動に対する影響が研究されはじめてきた⁴⁾。

(4) 脂質組成

荷電脂質(PS, PI[ホスファチジルイノシトール]など)を加えることによる表面電荷密度の変化は静電膜容量だけでなくチャネルに対しても多大な影響がある。特にイオン透過について平面膜で詳細に検討されてきた^{24, 40)}。

脂質組成によって相転移温度は異なる⁸¹⁾。相転移温度の上下で膜の物理的性質が変化するのでチャネルの活性に影響する¹²⁾。脂質分子はその形状によって集合体として特徴的な構造をとる。例えば PC は円柱状で二重膜相(L_α)をとりやすいが、ホスファチジルエタノラミン[PE]は頭部が小さい円錐形で六角構造(H_\parallel)をとる。このような構造の多型性が膜融合などの膜現象に重要な役割を担う²⁵⁾。

C. 膜蛋白組み込み法

手前のコンパートメントを cis 側、他側を trans 側と呼ぶ。操作のし易い cis 側に膜蛋白やベシクルを加えることが多い。電流の突然のジャンプとそれに引き続くコンダクタンスの遷移、あるいは次々と起こる電流のステップ⁴⁴⁾でチャネルが平面膜に組み込まれたことがわかる。

(1) 膜融合

平面膜にチャネルを組み込むのに最もよく使われる方法である³⁸⁾。膜分画やりポソームに組み込んだ膜蛋白に対して適用する。膜分画には目的とするチャネル以外のものが含まれていることもあるが、チャネルに対する処理としては実験操作上もっともマイルドである。ホモジェナイズすら不必要な膜分画もある⁷⁰⁾。

膜融合を促進する条件は次のようなものである^{15,26,38}). i) 浸透圧差(ベシクル内に水が流入するような条件), ii) ベシクルが溶質に対して透過性が高いこと(イオンチャネルを含んだベシクルの方が含まないものより融合しやすい.), iii) 平面膜のリン脂質組成に酸性リン脂質が含まれていること(酸性リン脂質[PS, PI]はカルシウム($[Ca^{2+}]_{cis}$: 1~10 mM)を介してベシクルを平面膜に強く結合させ融合の確率を高める. ただしイオン透過の解釈において表面電荷の影響を考慮する必要がある.), iv) 平面膜のリン脂質組成に PE が含まれていること(PE は脂質平面膜中で非二重膜(六角状)構造を取る²⁶).), v) 溶媒含有膜(溶媒含有膜の方が無溶媒膜より融合しやすい.), vi) 攪はん(非攪はん層を小さくし, ベシクルが平面膜に接近し易くする.), vii) 平面膜のごく近傍からベシクルを吹き付ける.

i), ii) と vi) は必須である. これらの条件は膜の組成や構造変化によって膜の不安定性をもたらしこれが膜融合を促進する.

1. 1 膜融合法

- ①対称溶液条件で膜形成後, 高濃度塩あるいは非電解質溶液を cis 側に加え, 膜の両側に浸透圧差をつける. 浸透圧差 3 : 1 位からはじめる. なお, ベシクル内浸透圧よりも trans 側の方が低張でなければならない.
- ②膜分画や精製蛋白の再構成ベシクルを加える. ベシクル内浸透圧が cis 溶液よりも高ければベシクルは体積膨張をおこし, 膜融合しやすくなる. 膜のごく近傍(数 10 μ m)からベシクルを吹き付けると効率がよい¹⁵. 加えるべき膜蛋白量は 0.2~50 μ g/ml である.
- ③攪はんする. 膜融合に攪はんは不可欠である.
- ④ときどき膜容量をチェックせよ. ベシクルの添加により膜容量が小さくなることもある.

一個のベシクルが一分子のチャネルしか含んでいないという保証はない. また膜融合が次々と起こることもある. 一個だけのベシクルを再

現性よく融合させるような条件を試行錯誤の中で選ばなければならない.

組み込まれた膜蛋白の配向はベシクル内での配向によって決まる. 例えば, ER を生化学的に取り出すと right-side-out であるので cis 側は細胞質側となる. 微絨毛ベシクルも right-side-out だが cis 側は細胞外である. リボソームは一般にベシクルより融合しにくい. またリボソーム上の膜蛋白の配向はランダムである.

1. 2 融合の停止

攪はんをやめるだけで膜融合は停止するが, 完全に膜融合を停止させるには, i) ベシクルを除く, ii) cis 側のカルシウムを除く, iii) 浸透圧を平衡にする. cis 側を灌流すればすべての条件は満たされる. 単に cis 側への EGTA の添加によって, あるいは trans 側への高浸透圧溶液の添加により融合は停止する.

1. 3 膜融合機序

脂質二分子膜には, 膜蛋白の関与なしにそれ自体の性質として膜融合する能力があるということは以前から知られていたが⁵⁵, その機序が次のようなものであることが明らかになったのはごく最近のことである. 膜融合は i) 膜張力負荷時, あるいは ii) 膜が高い曲率を持った時に, 2 枚のリン脂質膜が近接して疎水性相互作用によって起こる²⁹. 張力や変形によってリン脂質の親水性頭部間の距離が離れ, その下に存在する炭化水素の疎水性部分が露出すると, 2 枚の膜の間に疎水性相互作用による吸引力が働いて速やかに接近・融合する. 膜融合の基本過程は脂質相互作用である. 融合促進膜蛋白の役割は融合を起こしやすくするため, 2 枚の膜を高い曲率に変形させ疎水性相互作用を促すものである⁴⁶. 膜融合は半融合という過程を経る(図 6). 2 枚の二重膜のうち相対する 2 枚の単層膜が消失し, 1 枚の二重膜ができる. 融合に先立つ融合ポアはこの半融合した二重膜に形成され, その実体は膜蛋白ではなく脂質自身であるといわれている⁴⁶.

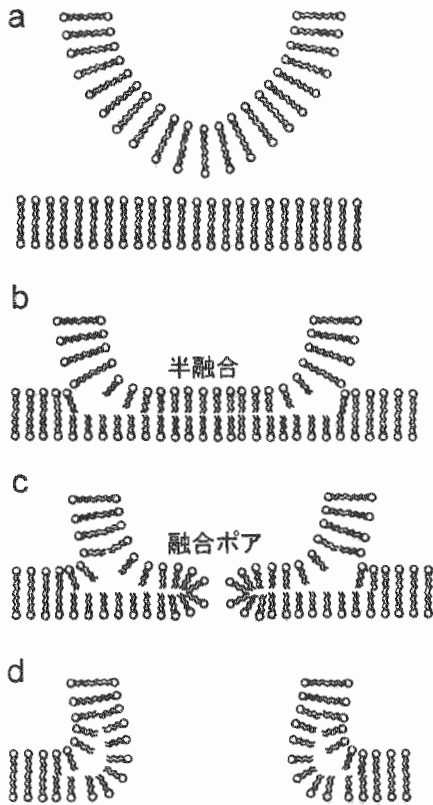


図6 膜融合過程

a. 高い曲率を持ったベシクル(上)が平面膜に接近している。b. 半融合。c. 融合ポア。d. 真の膜融合。

膜張力増大のために平面膜法では浸透圧差を利用する。ベシクルが平面膜に結合すると、ベシクル内と trans 側との浸透圧差で平面膜とベシクルの2枚の膜を経て水が流入し、ベシクル内圧が上昇する。体積膨張による膜張力の増大により膜融合が起こると考えられている。ここでベシクル上のチャネルの有無がベシクル内圧上昇の程度を規定する¹⁵⁾。もしベシクルがチャネルを含まないリポソームであると、ベシクル内静水圧の上昇に従って水は cis 側へ流出する(図7 A左の白矢印)。cis 側からベシクル内へ十分な量の浸透圧溶質を流入させるようなチャネルが存在すれば(図7 B黒矢印)体積膨張は促進する。trans 側からの水流入によるベシクル内溶質濃度の希釈がおさえられるからである。

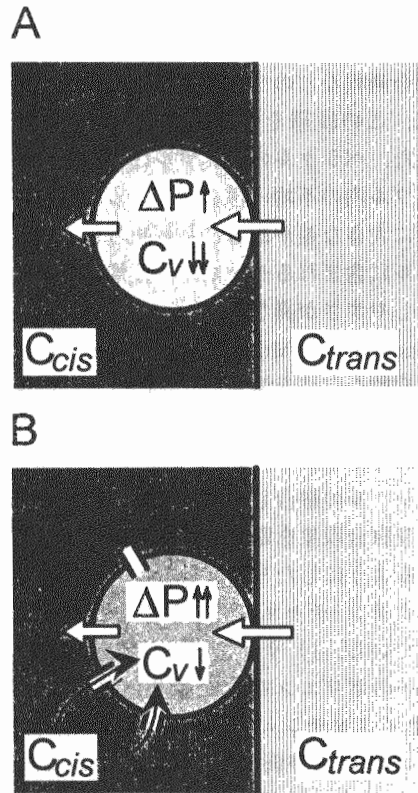


図7 平面膜とベシクルでの水と溶質の流れ

A. ベシクルにチャネルを含まない時、 $C_{cis} > C_{trans}$ 。なお、 C_{cis} などの記号は溶質濃度を表わす。水の流れ(白矢印)は trans 側からベシクルへは浸透圧差によって、ベシクルから cis 側へは静水圧差によって起こる。B. ベシクルにチャネルを含む時、 $C_{cis} \approx C_v > C_{trans}$ 。黒矢印：溶質の流れ、cis 側とベシクル内が等浸透圧でも水の流入によって溶質濃度は下がる。溶質を透過するチャネルがあればベシクル内の溶質濃度は高く維持される。したがって $\Delta \Pi_{channel} > \Delta \Pi_{no channel}$ 。ただし $\Delta \Pi$ はベシクルと trans の間の浸透圧差。

ベシクルの平面膜への融合過程を一般の膜融合過程の枠組みで捉えようと、ベシクルが平面膜に結合して張力発生によって半融合が起こり、融合ポアの発生にも張力が寄与する、と考えると理解できる。溶媒含有膜と無溶媒膜での膜融合の頻度の差は膜の変形能の差によるものであろう。溶媒含有膜は膜の厚さの変化が起こり易く、局所的に“えくぼ”やレンズ(二分子膜の間に有機溶媒が蓄積しレンズ状になったもの)などの異なる曲率を持った膜が存在する⁸⁹⁾。

(2) ナイスタチン法

平面膜法の実験で律速段階になるのはベシクル融合過程などのチャネル組込み段階である。従来、この段階を完全にコントロールできなかった。ベシクルのサンプルによる差、同一のサンプル内の不均一性などによって融合されやすさに大きな差があることが知られている。ベシクルに含まれるチャネルの種類によっても融合のしやすさが異なる。

Woodbury と Miller⁹¹⁾はナイスタチン法という画期的な方法を開発した(図8)。これはすべてのベシクルにあらかじめ外来性のチャネル、すなわちナイスタチン=チャネルを組込み、個々のベシクルの融合しやすさを均一化すると同時に、膜融合現象を電氣的にリアルタイムで観察できるようにしたものである。その原理は、ナイスタチン=チャネルの3つの特性をうまく利用している。i) ナイスタチンは疎水性の高い低分子のポリエーテルであり、膜相に移行しやすい。ii) ナイスタチン=チャネルはカチオンとアニオンの選択性が弱い(ややアニオンに選択性²¹⁾)ため大量の溶質を輸送でき、ベシクル内圧を増大できる。iii) ナイスタチン=チャネルはステロールを含まない膜では存続できない。エルゴステロールをベシクルにのみ含ませ、平面膜には含ませないというのがこの方法の要点である。

ステロール コレステロール、エルゴステロールなど(図2)。ただしエルゴステロールの方がナイスタチン=チャネルの活性を維持しやすい。ナイスタチン単量体がオリゴマー(10量体)となってチャネルを形成する際に糊の役目をしているといわれている。

1個のベシクルが平面膜に膜融合すると、ベシクル内ですでに開いているナイスタチン=チャネルが電流のジャンプとして直ちに現れる(図9 Bc)。ベシクルがチャネル蛋白を含むと、ナイスタチン=チャネルによる集合電流の上に、開閉を示す単一チャネル電流が認められる。融合後しばらくはベシクル膜のエルゴステロール成分が局所に留まるため(膜の黒い部分)ナイ

スタチン=チャネルの活性も持続する(図8 Bd)がエルゴステロール濃度が拡散のため希釈されるに従ってチャネル活性は次第に消失していく(図8 Be)。ベシクルに含まれていたチャネル蛋白は活性が持続する。なお通常のイオン環境ではナイスタチンのコンダクタンスは小さく単一チャネルとしてではなく巨視的電流として記録できる。ナイスタチン=チャネル活性の消失はゆっくりした電流の緩和消失過程として観察される。

従来、チャネル活動が観察できない場合、膜融合していないのかチャネル自体に問題があるのか判断がつかなかった。この方法を適用することによって膜融合が可視化されたため、チャネルに問題があるかどうかは明らかである。ナイスタチンがベシクルに均一に分布していると仮定すれば、一過性の電流量は個々のベシクルの大きさをあらわす。このことからベシクルのサイズの不均一性を見積もることができる。またベシクル内で機能しているチャネルの存在確率がわかる。

細胞内膜系(ER)はコレステロールを含まない¹³⁾。ベシクル懸濁液にエルゴステロールを単に加えてもベシクルには取り込まれない。エルゴステロールを含んだリポソームをあらかじめ作りそれをベシクルに融合させるというステップが不可欠である。ナイスタチン含有ベシクルの作製法と、蛋白含有ベシクルとナイスタチンベシクルの融合法について述べる。

ナイスタチン含有リポソームの作製(図9)

- ①リン脂質組成(モルパーセント)：PE 50%，PC10%，PS 20%，エルゴステロール20%。
- ②リン脂質 1 mg/100 μ l クロロホルムに 2 μ l のナイスタチンストック溶液(10 μ g)を加える。
- ③窒素ガスで溶媒を飛ばした後、NaCl 溶液 0.2 ml を加える。
- ④ソニケーション(バス)10~100秒。ソニケーター(ブランソン, Sonifier II)の破碎ホーンを溶液に浸す方法では金属の混入が避けられ

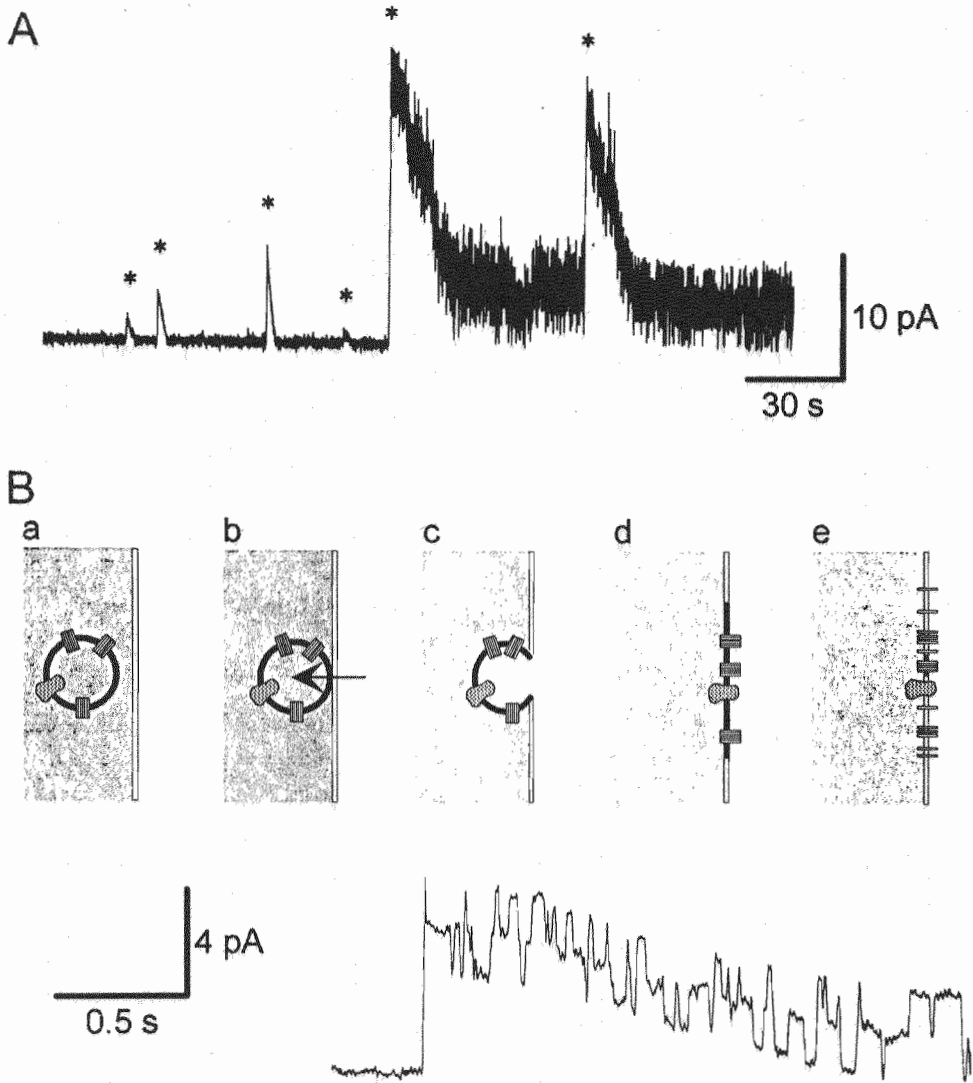


図8 ナイスタチン含有ベシクルの融合とナイスタチン=チャネルの消失過程

A. ナイスタチン法による電流記録。*が融合による電流ジャンプである。電流は一過性で秒オーダーの消失過程を示す。はじめの4つの融合事象はチャネル蛋白を含まないので電流レベルが基線まで戻る。融合と同時にチャネル蛋白の活動が観察され、ナイスタチン=チャネル消失後も持続して活性を保つ。B. ナイスタチン含有ベシクルの融合。不定形なのがチャネル蛋白、長方形のものがナイスタチン=チャネルである。白線は平面膜(エルゴステロールを含まない)を表す。膜の左側がベシクルを添加する cis 側である。ベシクル膜を表す黒い円はエルゴステロールを含んでいることを示す。a) cis 側の方が浸透圧が高い、cis 側とベシクル内は等浸透圧である。b) ベシクルが平面膜に吸着するとベシクル内と trans 側との浸透圧差で水がベシクル内に流入し膨張する。c) 融合直後の様子。ここで電流のジャンプが起こる。d) 平面膜の黒い部分は未だエルゴステロールを含んでいる。e) エルゴステロールの希釈とともにナイスタチン=チャネルは単量体に解離する。なおこのチャネルはシビレイ電気器官から得られた Cl チャネルである。約50%のサブコンダクタンスレベルを持つ単一チャネルである。(Woodbury & Miller⁹¹)より改変)

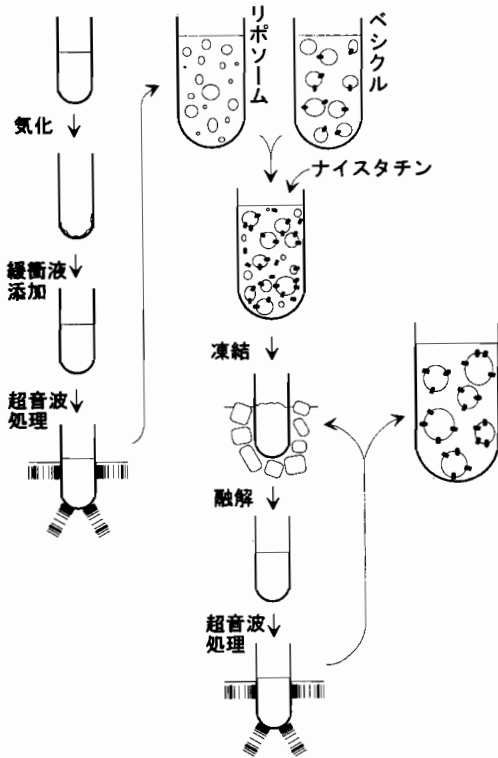


図9 ナイスタチン含有蛋白リポソームの作製
左) エルゴステロール含有リポソーム作製, 中央) リポソームとベシクルの融合とナイスタチンの添加. 凍結⇒融解⇒ソニケーションのサイクルを3回繰り返す.

ない。バスソニケーション(カップ型破碎ホーン)が望ましい。このときソニケーターの水の水位と試験管内の液面を合わせる⁵²⁾。

- ⑤リポソームをドライアイス/エタノールで凍結。
- ⑥使用直前に解凍し, 5~15秒ソニケーション。(大きな単層リポソームを作るため)

リポソーム溶液のナイスタチンの最終濃度は50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。ナイスタチンコンダクタンスから予想されるリポソームの大きさは最後のソニケーション時間に反比例する。膜上のチャネル数はナイスタチン濃度の高い次数に依存する。濃度が少し低いとチャネルを形成しないし、高すぎるとカチオン選択性チャネルが形成される(double-sided action²¹⁾)。困ったことにこの

チャネルはエルゴステロール依存性ではない。至適濃度は50~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

チャネル蛋白含有リポソームの作製(図9)

- ①リポソーム作製: ナイスタチンを含まないリン脂質(PE 50%, PC 10%, PS 20%, エルゴステロール20%: 2 mg)の溶媒を蒸発させ, 300 mM NaCl 溶液 200 μl を加え, 1分間ソニケーション。
- ②精製膜ベシクル(50~100 μg ; 保存緩衝液は400 mM 蔗糖)を300 mM NaCl で平衡したセファデックス G-50 カラム(ファーマシア)を通す。蔗糖はベシクルとリポソームの融合を妨げるからである。
- ③膜ベシクルをナイスタチン含有リポソームに加える。
- ④ナイスタチンを加え, 最終濃度が60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とする。
- ⑤凍結。ドライアイスにエタノールを加えた中に試験管を入れ凍結させる。
- ⑥融解。
- ⑦ソニケーション15~20秒。ソニケーションによってベシクルの大きさは小さくなる。
- ⑧凍結⇒融解⇒ソニケーションのサイクルを3回繰り返し, 膜蛋白を加えたリン脂質に分散させる。

ナイスタチン法の問題点は, エルゴステロールをベシクルに取り込ませるために凍結融解法が必要なことである。この過程でチャネル蛋白が不活性化される可能性がある。またニコチン性アセチルコリン受容体のようにチャネル活性にコレステロールが不可欠なチャネルには使えない。平面膜にコレステロールを含ませるとベシクル融合後, ナイスタチン=チャネル活性が消失しないからである。

(3) 直接挿入法

チャネル形成抗生物質の多くは両親媒性の小分子(ペプチド¹⁾, ポリエン²¹⁾など)であるので水相から容易に膜相に移行する。多くの種類

が知られているチャネル形成毒素蛋白(コリシン⁷⁴), エグソトキシン²²), ラトロトキシン³⁷) などの中には大きな蛋白分子のものもあるが, そもそも水相から膜相に移行できるような特殊化した機能が分子デザインされている. 膜への組み込みの際に大規模な構造変化が起こる⁷⁴). 組み込まれるチャネルの向きは一定である. したがってこれらのチャネルの研究は比較的容易で毒素が膜をヒットする確率の問題である(膜面積と濃度による).

一方, 可溶性膜蛋白がどのようにして水相から膜相に移行するのか明らかではない. 可溶性蛋白の本来の膜貫通部分を覆っている界面活性剤がどのような過程で平面膜脂質に置き代わるのか? 真核生物では生合成されたごく限られた特定の蛋白が翻訳後膜透過という過程をとるが, それにはシャペロンなど多くの蛋白が関わってモルテングロビュール構造などを介して進むといわれている¹⁸). 界面活性剤で可溶性された蛋白と同一に議論することはできない.

直接挿入法の場合, 蛋白濃度を連続的に変化させてチャネル活性の出現を見る以外に方法はない. しかし, 可溶性蛋白の場合, 濃度を高めたからといって膜への取り込みが促進するわけではない. 特に可溶性蛋白の濃度上昇とともに界面活性剤の濃度も上昇するという厄介な問題がある. これと関連して重要なことは, 使うべき界面活性剤の種類を選ぶことである. 界面活性剤(Triton X など)の中には膜を攪乱し, みかけ上チャネル様の振る舞いを示すものがある³⁸). 可溶性に使った界面活性剤単独での平面膜への効果をあらかじめ検討しておく必要がある. チャネルが組み込まれたら cis 側を灌流することによってさらにチャネルが組み込まれるのを防ぐ.

ミトコンドリア電位依存性アニオンチャネル⁸⁶)のように直接挿入法での研究が確立したものはよいが, 新しいチャネル蛋白に対しては直接挿入法と並行して, リポソームへ一旦再構成してから膜融合過程を経て平面膜に組み込む方法を行っておく必要がある.

(4) 単層展開法(図10)

- ①通常の張り合わせ法に使うリン脂質溶液(4 mg/ml ヘキサン)を水面上に添加し, 気-液界面に単分子層を形成する.
- ②チェンバーの cis 側にベシクルを加える.
- ③両側の水位を上げ平面膜を張る. チャネル分子を含んだ単層膜の部分が穴を通過することを期待する.

この方法は張り合わせ法にのみ適用できる. 両親媒性のリン脂質は, 水中でミセルを作るのと同様に, ポテンシャルの谷間である気-液界面に吸着し単分子層を形成する⁶⁹). ベシクル

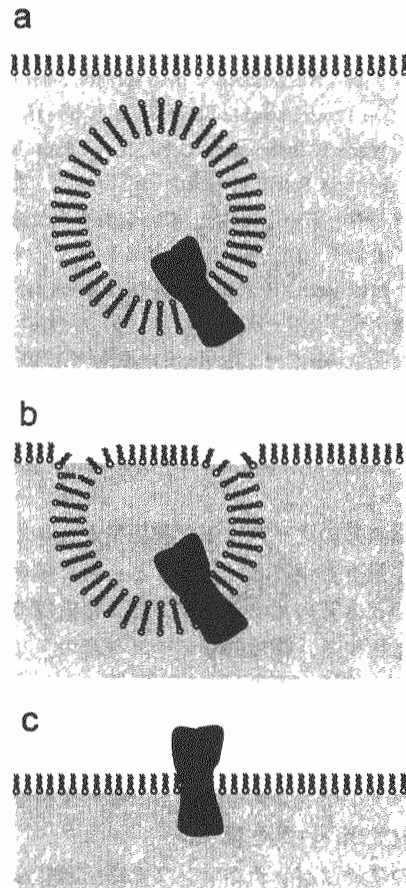


図10 単層展開法

a. 気-液界面に単分子層を形成する. b. 水中のベシクルは単分子層に接触する. c. ベシクル上のチャネルは単分子層に移行する.

を形成するリン脂質も自発的に気-液界面に単層展開する。ベシクルに組み込まれていた膜蛋白も単分子層のなかに埋めこまれるが膜蛋白のオリエンテーションはランダムである。張り合わせ法ではこの単層を張り合わせればよい。この方法ではチャネル蛋白が空気に暴露することによって変性する可能性がないとはいえない。しかし組み込み方法の選択肢の一つとして、他の方法が有効でないときに利用できる。

D. 平面膜系のエレクトロニクス

電気系のセットアップの例を示す。

アンプ：Dagan Integrating patch clamp system 3900
あるいは

Warner Instrument Corp., Model BC-525B bilayer clamp

フィルター：NF Electronic Instruments, Dual Channel Programmable Filter 3624 あるいは
Warner Instrument Corp., Low Pass Bessel Filter 4 Pole, LPF-100A

データレコーダー：ソニー PCM-501ES を改造したもの¹⁰⁾：DC~44.1 kHz あるいは

Instrutec, VR-10B Digital Data Recorder

ビデオテープレコーダー

チャートレコーダー：Gould, EasyGraf TA240

除振台：明立, Visolator

その他, コンピュータ, A/D コンバータ (Axon Digidata), ソフトウェア (pClamp) など。

平面膜系のノイズは平面膜面積が大きく、大静電容量をもつことに起因する。特に膜面積が大きいとき音のピックアップによる低周波ノイズが派生する。機械的なノイズや音のノイズはいずれも溶液が振動したり平面膜がゆれたりして膜面積(膜容量)がわずかに変化することによる。通常のシールドケージではなく、密閉したファラディボックスを用いる。厚い素材を使い防音材でボックスを覆う。

この章ではパッチクランプでは問題にならないもので平面膜系ではじめて問題になる点について述べたい^{71,90)}。

(1) バックグラウンド電流ノイズの最小化

ギガオームシールパッチクランプ法で問題となる、ヘッドステージ・フィードバック抵抗(50 GΩ)やシール抵抗に起因する熱雑音電流は平面膜記録では取るに足りない。平面膜法におけるバックグラウンドノイズは主に、大きな平面膜容量を介して電位ノイズを電位固定することに起因する。これは

$$I = C \frac{dV}{dt} \quad (5)$$

の関係を思いおこせば直感的に理解できる。特に電位の高周波数のゆらぎは大きな電流ノイズとしてあらわれるので重大である。ノイズ源のスペクトル密度は帯域と容量の2乗に比例して大きくなるので、膜容量の大きな平面膜では記録帯域が制限される。具体的な電位ノイズ源は：1) パッチアンプのFET(電界効果型トランジスタ)入力, 2) 電位コマンド回路, 3) アクセス抵抗, である。

1.1 入力電位ノイズ

ヘッドステージ入力電位ノイズは、全入力容量 C_t を介して電流ノイズを発生させる。そのスペクトル密度 $S_{i(f)}^2$ はオームの法則に従い次のようになる⁷⁶⁾。

$$S_{i(f)}^2 = \frac{e_n^2}{X_c^2} \quad (6)$$

e_n はヘッドステージ入力の電位 rms ノイズ ($V/\sqrt{\text{Hz}}$), X_c は平面膜の容量性リアクタンスである。容量性リアクタンスは

$$1/(2\pi fC_t) \quad (7)$$

f は周波数, また

$$C_t = C_b + C_s + C_{FET} \doteq C_b \quad (8)$$

C_b は平面膜容量, C_s は浮遊容量, C_{FET} はFET入力容量である。

$$S_{i(f)}^2 = e_n^2 (2\pi fC_b)^2 \quad (9)$$

内部電位のノイズは平面膜に相当する大きさの容量をアンプに接続することにより簡単に評価できる。パッチクランプ法に適したアンプが平面膜法にも適切であるという保証はない。

電位の外部コマンド、特にコンピュータからの D/A 出力を使うときはそのノイズに注意する必要がある。

1. 2 アクセス抵抗熱電位ノイズ

アクセス抵抗 (R_a = 平面膜と直列に存在する溶液と電極の抵抗)⁵⁾における熱電位ノイズを平面膜容量 (C_b) を介して電位固定することによる電流ノイズは、そのスペクトル密度が次のようになる。

$$S_{i(f)}^2 = 4 kT \operatorname{Re}\{Y(f)\} \quad (10)$$

k はボルツマン定数、 T は絶対温度、 $\operatorname{Re}\{Y(f)\}$ は、直列な R_a と C_b のアドミッタンスの実部 (コンダクタンス) である。これは

$$\operatorname{Re}\{Y(f)\} = \frac{(2\pi f C_b)^2 R_a}{1 + (2\pi f C_b R_a)^2} \quad (11)$$

一定の帯域において R_a の下限では

$$\operatorname{Re}\{Y(f)\} = R_a (2\pi f C_b)^2 \quad (12)$$

となり、7 式と同様の形となる。すなわちヘッドステージの内部雑音と、直列の膜容量とアクセス抵抗で発生する電位雑音は同等に表現できる。 R_a の上限では

$$\operatorname{Re}\{Y(f)\} = 1/R_a$$

となる。 R_a に対する依存性が線型から逆数型へ移行する際、ノイズの最大値があらわれる。

1. 3 ノイズの評価

$S_{i(f)}^2$ を一定の帯域で積分すると電流分散値が求まる⁸⁾。図11は電流ノイズ (peak-to-peak 値) のアクセス抵抗と膜容量に対する依存性である。直流から 1 kHz の帯域における値を示している。ノイズはアンプの入力電位ノイズの成分 (式 9, ただし $e_n = 6 \text{ nV}/\sqrt{\text{Hz}}$) とアクセス

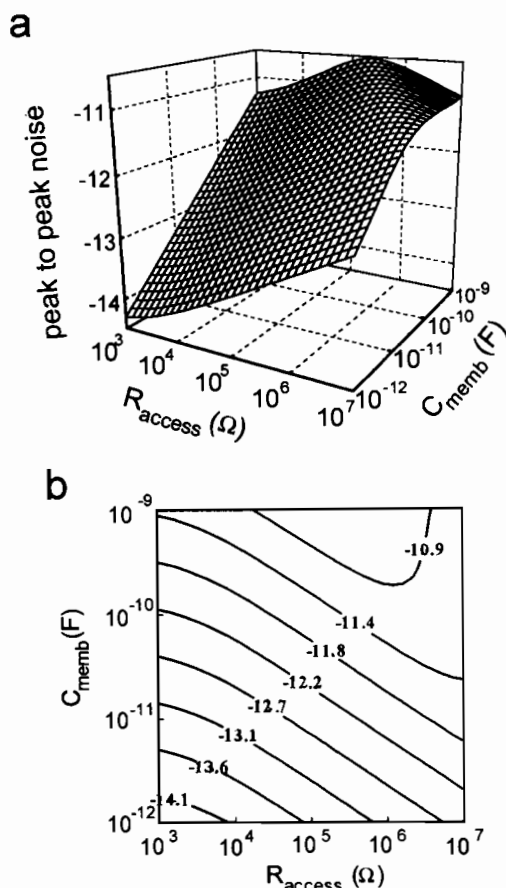


図11 平面膜雑音の膜容量 (C_{memb})・アクセス抵抗 (R_{access}) 依存性。
A. 3次元図。B. 等高線図。ただし、ノイズは対数値で表わしている。単位: A.

抵抗における電位ノイズの成分 (式10) の和として示している。アクセス抵抗が数 $k\Omega$ 以上ではアンプ入力ノイズの寄与はほとんど無視でき、アクセス抵抗電位ノイズが主なノイズ源となってくる。ノイズを下げるにはアクセス抵抗、膜容量のいずれかを下げても効果がある。しかし膜面積が大きい方が膜融合の効率が高いのでアクセス抵抗を減少させることがノイズ減少のための現実的な手段となる。ただし膜容量が 100 pF 以上になるとアクセス抵抗 $1 \text{ M}\Omega$ 以下でもノイズの極大値が現われるので、このような抵抗値は避けるべきである。アクセス抵抗と膜容量のノイズに与える定量的な相互関係は等高線

図(図11 b)から明らかである。パッチクランプで使われる数 M Ω 、数 pF の時と同等のノイズレベルは、アクセス抵抗が数 k Ω であれば膜容量が数 10 pF でも実現できる。

アクセス抵抗 電極からチャネルまでの間に直列に介在する以下の成分である；電極-電解質界面、塩橋、緩衝溶液、膜近傍の幾何学的形状。このうち膜近傍の幾何学的形状による抵抗が制御しうる主要要素である。ピペットを使うのにくらべチャンバーを使う平面膜の実験ではアクセス抵抗は極めて低く、通常数 k Ω から数 10 k Ω である。

以上の考察を総合してノイズを小さくするための方法は次のようなものである。1) 平面膜容量の減少。2) 内部電位ノイズの低いアンプを使う。3) 低ノイズ電位コマンド源を使う。4) アクセス抵抗を小さくする。5) チェンバーとくに隔壁の素材を選ぶ。

(2) 容量性フィードバック

最近のアンプはフィードバックとして抵抗の代わりに容量を使うものが多い(Dagan, Axon, Warner)。ヘッドステージは積分器となり、これを微分することによって電流を測定できる。この方が従来の高抵抗フィードバックのものに比べて、原理的に熱雑音などのノイズが小さく、帯域が広くとれる⁷¹⁾。

この方式ではフィードバック容量が飽和した時に放電する必要がある。この放電はフィードバック容量と並列に入った 10 k Ω 程度の低い抵抗を介して速やかに行われる。通常、放電は自発的に起こるが、電位ステップに同期して強制的に容量の放電を行うと、低抵抗を流れる大電流(< 1 mA)によって、平面膜容量を速やかに充電できる。全ての容量性フィードバックのアンプには外部トリガーによる強制的容量放電のための入力端子がついている。

E. 高解像度記録法

前章の議論から明らかのように、平面膜法では膜面積を小さくするだけでなくアクセス抵抗

も低くすることができるので、パッチクランプ法よりも原理的に低い定常ノイズレベルを実現できる可能性がある。いかに小さな平面膜を簡単にかつ安定に形成できるかが実際上の最大のポイントである。

(1) ティップ=ディップ法

ティップ=ディップ法とは小さな面積の平面膜をガラスピペットの先端に形成する方法である²⁰⁾。ピペット先端を単分子層を通過させることによって膜を形成することからこの名称がついた。ティップ=ディップ法にも張り合わせ法とペインティング法に相当する2種類がある。張り合わせ法には通常のパッチ電極、改良法にはやや太いものを使う。

1. 1 張り合わせティップ=ディップ法

この方法は通常のパッチ電極(数 M Ω)を使ってその先端に2枚の単分子膜を張り合わせようというものである^{16, 69, 83)}。

- ①リン脂質の単分子層を気-液界面に展開する(図12 a)(II A(2)2. 3 参照)。
- ②パッチ電極の先端を気-液界面を通過させる(図12 b)。
- ③パルス電位をかけ入力抵抗をモニターする。
- ④界面を数回通過させることによってギガシールが達成できる(図12 e)。

張り合わせ法における膜形成が本当に図のような過程を経るのか、また二重膜がその支持体であるガラスとどのような関係にあるのか、明らかではない。単層展開すると単層膜だけでなく二重層(duplex film)を形成するのでこれが膜の安定性に寄与している可能性はある。

1. 2 改良ティップ=ディップ法

平面膜形成に対する考察と以下に述べるパンチアウト法の経験から、安定な膜を形成するために膜と支持体との関係は疎水性相互作用のほうがより好ましいことが予想された。そこで直径約 10 μm のガラスピペットの先端に平面膜

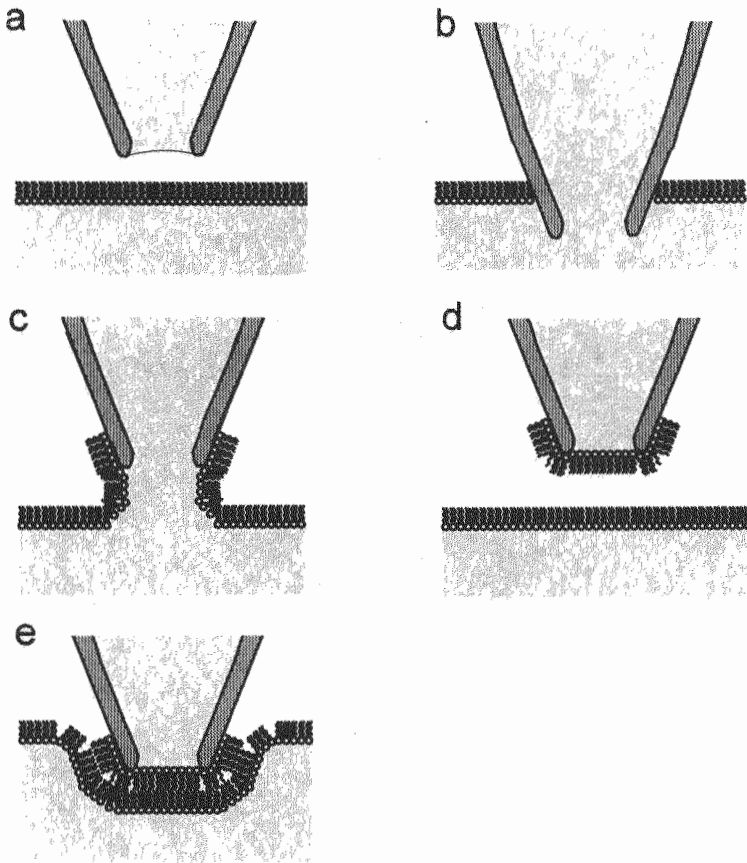


図12 張り合わせタイプ=ディップ法

を形成することを試みた^{63,68)}。ピペットの作製法は改良タイプ=ディップ法とパンチアウト法に共通である。ただし、先端の直径はパンチアウト法では約 $30\ \mu\text{m}$ 、タイプ=ディップ法では約 $10\ \mu\text{m}$ である。

ガラスピペットの作り方

- ①パイレックスガラス管(例えば, サミットメデイカル, 外径 $1.4\ \text{mm}$)を強酸, クロロホルム/メタノールで洗う(器具洗浄法参照)。
- ②ガラス管を引く。通常の白金フィラメントを使うと金属蒸着が著しく, 膜形成時にいわゆるシール抵抗を十分高くすることができない。通常のプラーにガラス管をセットし, 細いガスバーナを使って熱する(図13a)。
- ③マイクロフォージ(成茂)の白金フィラメント

をパイレックスガラスでできるだけ厚くコートする。毎日, 新たにコートしなければならない(b)。

- ④フィラメントを赤くならない程度に暖め, ガラス管の直径が $30\ \mu\text{m}$ あるいは $10\ \mu\text{m}$ のところでフィラメントのガラスコートに接触させる(c)。
- ⑤フィラメントのスイッチを切るとフィラメントの位置がずれ, 引っ張り力が発生して, ガラス管の接触部位の上端で直角に割れる(d)。真円でなければならない。
- ⑥ガラスピペットの先端をわずかにヒートポリッシュする(e)。
- ⑦trioctylsilane をベンジンで希釈し10%溶液とする。
- ⑧ガラスピペットの先端にシリコン液を満た

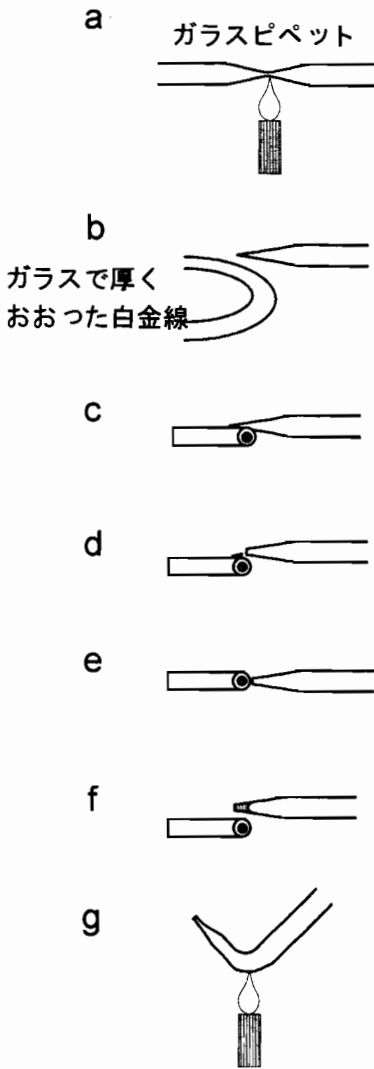


図13 改良ティップ=ディップ法のためのガラスピペットの作り方.

し、先端から弱く熱したフィラメントで暖め表面をシリコン化する。

⑨先端から約 1 cm のところで直角に曲げる (f)。

⑩クロロホルム/メタノールで洗う。

なおティップ=ディップ法では⑨は必要ない。

この方法で作製したピペットの特徴は先端部のガラスの厚さが $1 \mu\text{m}$ 以上と十分厚いので静電容量に対する寄与が小さい。

改良ティップ=ディップ法

張り合わせティップ=ディップ法との差は有機溶媒にヘキサンのような揮発性の高いものを使わず、気-液界面に展開した単層の上に有機溶媒が常に存在することである。したがってチャネル蛋白は直接空気に暴露しない。

①ガラスピペターに満たした塩溶液 (5 ml) の表面にリン脂質溶液 ($\text{D}\Phi\text{PC}$ 20~40 mg/ml ヘキサデカン) 5 μl を加える。気-液界面に単層が展開する。ヘキサデカンは揮発しにくく、レンズ状、あるいはガラス壁に接してバルクとして存在する。

②ガラスピペットを圧負荷用の側孔を持った通常のパッチクランプ用電極ホルダー (E. W. Wright, USA) にセットする。

③直径 10 μm のガラス電極の先端をヘキサデカン層に留める。プレコーティング。

④先端に詰まったヘキサデカン層を押し出し、単分子膜とヘキサデカンを含んだ層を通過させる。しばしば大量のヘキサデカンのため二重膜は形成できない。その場合ヘキサデカン層を押し出した後、再び層を通過させる。これを繰り返す。

⑤二重層ができ始めるとその後は何度でも膜が形成される。シール抵抗は $1 \text{T}\Omega$ に達する。

この方法による膜形成過程はペインティング法と同様である。直径 30 μm 以上のピペットでは膜形成における薄膜化過程の容量増大が観察できる。ピペット先端の直径と膜容量の測定から明らかに環状バルク相が存在するといえる。ペインティング法ではデカン以外の有機溶媒を使うと薄膜化しないことがあるが、この方法では有機溶媒による膜形成の差は認められない。

1. 3 張り合わせティップ=ディップ法と改良ティップ=ディップ法

張り合わせティップ=ディップ法は膜との相互作用が親水性であるのでシール抵抗を十分にあげることができないが、改良ティップ=ディッ

プ法では疎水性相互作用による高いシール抵抗と長時間安定な膜が形成できる。張り合わせティップ=ディップ法ではパッチ電極を使うので電極抵抗(アクセス抵抗)が高くノイズ源となるのに対し、改良ティップ=ディップ法で使う直径 $10\ \mu\text{m}$ の電極抵抗は約 $10\ \text{k}\Omega$ であるため低ノイズである。

ティップ=ディップ法では膜面積が小さいため二重膜が形成されたことを確認するのは光学的にも電気的にも難しい。グラミシジンを水相に加え単一チャネル活性を観察することが最も簡単で確実な確認法である。

ティップ=ディップ法へのチャネルの組込みに膜融合法を使うのは効率が悪い。膜に取り込まれやすいチャネル形成毒素などは直接挿入法、その他のものは単層展開法を使う。この方法では単層上にすでに存在するチャネルにピペットの先端がヒットすることによって組み込まれる。

(2) 削り取り小孔法

この方法はチェンバーの穴をピペット並みの小さなものにすることで膜容量を小さくする⁹⁰⁾。削り取り法では鋭いエッジをもった $50\ \mu\text{m}$ 以下の穴を比較的容易に作る事ができる。小さい穴の場合ペインティング法では一般に薄膜化が起らないことがあるが、削り取り法で作った小孔ではこのような小さなものでも薄膜化が可能である。作り方の要点はいかに先

端までシャープなステンレス棒を作るかに尽きる。開口角が大きく、アクセス抵抗がピペットを使ったときよりも小さくできる。

膜面積が小さいので融合確率は低くなる。ベシクルを含んだピペットを膜のごく近傍にもってきて内容物を平面膜に極短時間(数ミリ秒)吹き付けるような効率のよい方法が必要である¹⁵⁾。 $30\ \mu\text{m}$ が膜融合とノイズのバランス点であるといわれている。

(3) パンチアウト法

ペインティング法でチェンバーに張った大きな膜(チェンバー膜)をパッチガラス電極で“パッチクランプ”するのがこの方法である³⁾。チャネル配向がはっきりしていること、両側溶液へのアクセシビリティ、という2つのチェンバー法の利点と、ピペット法の高分解能という利点をあわせ持ったものである。チャネルを大量に膜に組み込むことができると、巨視的電流と平行して単一チャネル記録ができる。

- ①ガラスピペットを圧負荷用の側孔を持った通常のパッチクランプ用電極ホルダーにセットする。
- ②ペインティング法でチェンバーに比較的大きな膜($500\ \mu\text{m}$ 以上)を張っておき、平面膜を透してピペットの先端を見ながら、膜に近づける。
- ③環状バルク相にピペットの先端を入れ、数分間放置する。これは穴をプレコーティングす

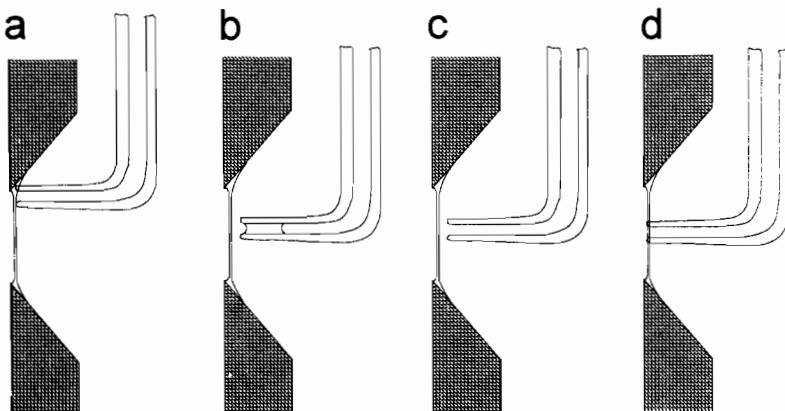


図14 パンチアウト法

ることに相当するコンディショニングである (図14 a).

- ④先端をバルク相から抜き、圧をかけて先端に詰まったリン脂質溶液を除く (b, c).
- ⑤チェンバー膜の二重層部分にパッチする. 電極先端をチェンバー膜に接触すると同時にパッチ膜が形成される (d). このことは電流ノイズが突然減少することでわかる. コンディショニングが不十分なときはチェンバー膜が破れる.
- ⑥ピペット先端の膜はくり返し形成できる. これには, i) ピペットへの圧負荷により破り, ii) チェンバー膜から引き抜き, iii) 引き抜く時, ピペット上に必ず膜が形成されるのでこれを破る, iv) 再びパッチする.

現在のところ膜融合法が可能で, しかも定常状態での分解能だけでなく過渡現象も捉えることができたという点で, 削り取り小孔法が最もバランスのとれた方法といえるだろう. しかし最高の分解能を得るためには改良ティップ=ディップ法が原理的に最も優れている. パンチアウト法は大量にチャネルを組み込むことができるかどうかにかかっている.

Ⅲ. チャネル電流記録

trans 側を基準電位 (0 mV) として, cis → trans 電流を正電流とする. 細胞小器官のための膜電位の定義は, 細胞小器官の内腔側を基準にして測定する. これによって細胞膜との連続性が首尾一貫した定義となる⁹⁾. 最近, ミトコンドリアなどに関しても膜電位が改めて定義された⁷⁸⁾.

以下に平面膜法を使いたいいくつかの例を示したい.

A. 細胞小器官のチャネル

(1) 過渡的単一チャネル電流記録

Wonderlin ら⁹⁰⁾ は平面膜にイカ巨大神経軸索の細胞質中を軸索輸送されている膜小胞をくみこんだ. この膜小胞には細胞体で合成され得

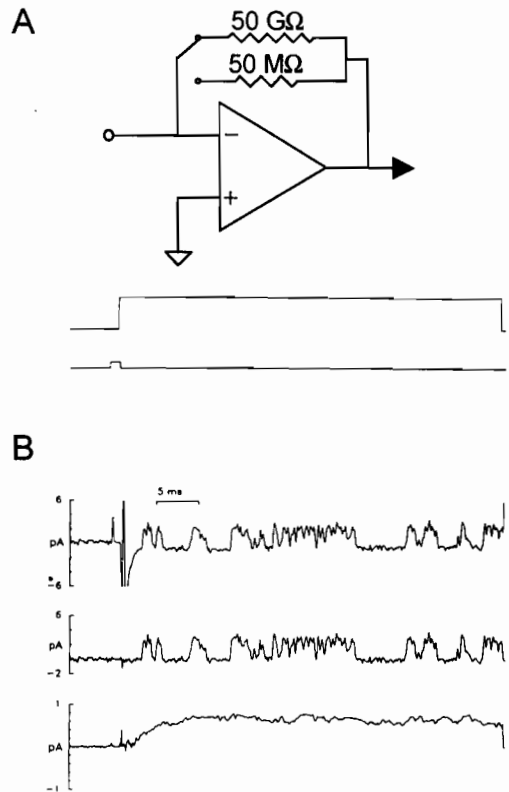


図15 イカ巨大神経軸索 K^+ チャネルの過渡的応答

A. ヘッドステージ回路と, 電位ステップと論理パルスのタイミング. 電位ステップ後 $25 \mu\text{s}$ で元のゲインに戻している. B. 電流トレース. 上: 電位ステップに対する応答の生電流トレース. 中: デジタルサブトラクション後の電流トレース. 容量性電流とスイッチングによるアーチファクトが除かれ, 速やかに定常に達している. 下: 集合電流. 240の電流トレースの平均電流. 集合電流は遅延整流性 K チャネルの巨視的特徴を示している. (Wonderlin ら⁹⁰⁾より改変)

来細胞膜に組み込まれるチャネル(あるいは使用済みのチャネル)が含まれている. 合成された蛋白を最終目的地の細胞膜で捉えるのではなく(細胞膜を取り囲むシュワン細胞のため外側からパッチクランプはできない), 細胞膜にソートされる過程の途中で捉えたのである. Na^+ , K^+ チャネルはともに細胞膜で認められるものと同様の特性を示した (図15). 運ばれているベシクルの中ですでに活性を持っていることになる. 特筆すべきは彼らが開発した削り取り小

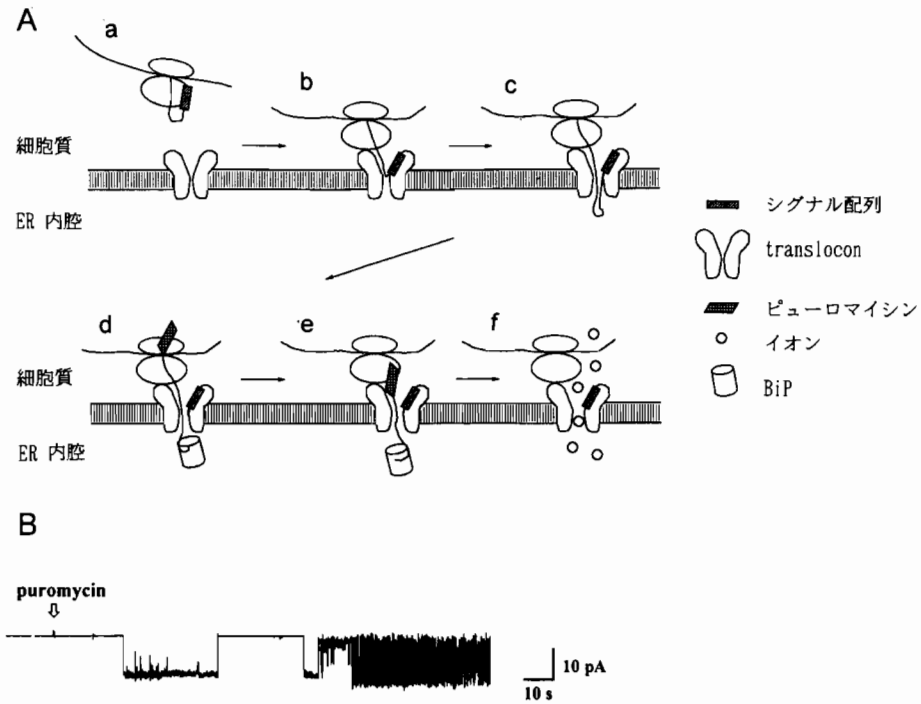


図16 ER の translocon チャネル

A. 膜蛋白, 分泌蛋白の合成と膜輸送. a. シグナル配列を持つ蛋白(膜蛋白, 分泌蛋白)はリボソームの上でシグナル配列が合成されると翻訳は一時中断し, ER に移動する. b. リボソームとシグナル配列は translocon に結合し, 翻訳が再開する. c. 翻訳された新生ペプチドは translocon のポアを透過し, ER 内腔に輸送される. d. ER 内腔にある BiP(Binding Protein)というシャペロンが蛋白の折りたたみを促進する⁴³⁾. このときピューロマイシンが細胞質側に存在すると翻訳が終結する(未成熟終結). e. 未成熟な新生ペプチドはポアを透過し, ER 内腔に遊離する. f. 開いたままの translocon ポアをイオンが透過する. B. 単一 translocon チャネル電流⁹²⁾.

孔法を適用し, 電位ステップに対する過渡的なチャネル応答を捉えることに成功したことである. 平面膜の面積を小さくし, チェンバーを使うことでアクセス抵抗を小さくするという工夫以外に, 電位ステップ応答を改善するために次のような方法を取った. パッチクランプのヘッドステージに論理回路を組み込み, フィードバック抵抗を高ゲイン(50 GΩ)と低ゲイン(50 MΩ)の間で電位ステップに同期して変え(電位ステップ前後の 1 ms だけ低ゲインにする.), 膜容量を速やかに充電する. デジタルサブトラクションによってステップ後 1 ms で定常のベースラインが得られ, 過渡的単一チャネル電流を記録できた. アンサンブル電流は巨視的電流と同様のキネティクスを示した.

電位依存性チャネルには電位依存性不活性化を示すものが多く, 平面膜においては不活性化をバトラコトキシンやプロナーゼで除いてはじめて定常状態での記録が可能であった²⁷⁾. Wonderlin らの方法は過渡的応答を示すチャネルを捉えることができたという点で新しい可能性を拓いたものといえる.

(2) Translocon

膜蛋白や分泌蛋白は翻訳と同時に(折れたたみが起こる前に)ER 膜を透過し(翻訳に共役した膜輸送), ER 内腔あるいは膜相に移行する. このとき新生ペプチドは ER 膜の脂質二重層ではなく特定の蛋白(translocon と呼ぶ)内を透過するということが確立されてきた. ペプチドの透過路が存在するのであれば, 通常のイオンが

透過するに十分な大きさのポアがあると考えられる。生化学的に取り出した粗面小胞体分画は図16Aのbからcの状態が存在する。SimonとBlobel⁸⁰⁾はこれを平面膜に組み込み、細胞質側にピューロマイシンを加えた。ピューロマイシンという翻訳停止剤は膜を貫通しつつある新生ペプチドの翻訳を終結させ(未成熟終結)、リボソームとの結合を失った新生ペプチドは translocon ポアから遊離・放出する。この開存したポアを流れるイオン電流を記録できたのである。私達はツメガエル卵母細胞から得た粗面小胞体を平面膜に組み込み同様の実験を行った。通常のイオンチャネルと同様の、ゲーティングを伴ったイオン選択性の低い単一チャネル電流として記録できた⁹²⁾(図16B)。translocon の分子実体が明らかになりつつある現在²³⁾、このようなアプローチは蛋白透過過程の分子機構を知る上に不可欠な透過路の構造とその動的な構造変化についての情報を与えてくれることであろう。

B. ニコチン性アセチルコリン受容体

チャネル蛋白の活性を保持したまま高い純度のものを得るための方法が確立してきた^{73,79)}。現在までに精製されたチャネルで平面膜に再構成されたものはニコチン性アセチルコリン受容体^{14,48)}、ナトリウムチャネル²⁷⁾、リアノジン受容体¹⁷⁾などである。

ニコチン性アセチルコリン受容体に適用した方法を概説する(図17)⁴⁸⁾。チャネルを可溶化の際に脂質はチャネル機能を保存する上で不可欠である⁶⁾。少量の脂質が界面活性剤からチャネルを保護していると考えられている。ここでは界面活性剤としてコール酸を使っているがこの濃度も重要である。(至適濃度: 2%。コール酸: 脂質=10:1)。可溶化チャネル蛋白をリボソームに組み込むには約10倍の高濃度の脂質が必要である。(至適条件は脂質: 蛋白>16:1)

シビレイの電気器官から精製したニコチン性アセチルコリン受容体をリボソームに組込

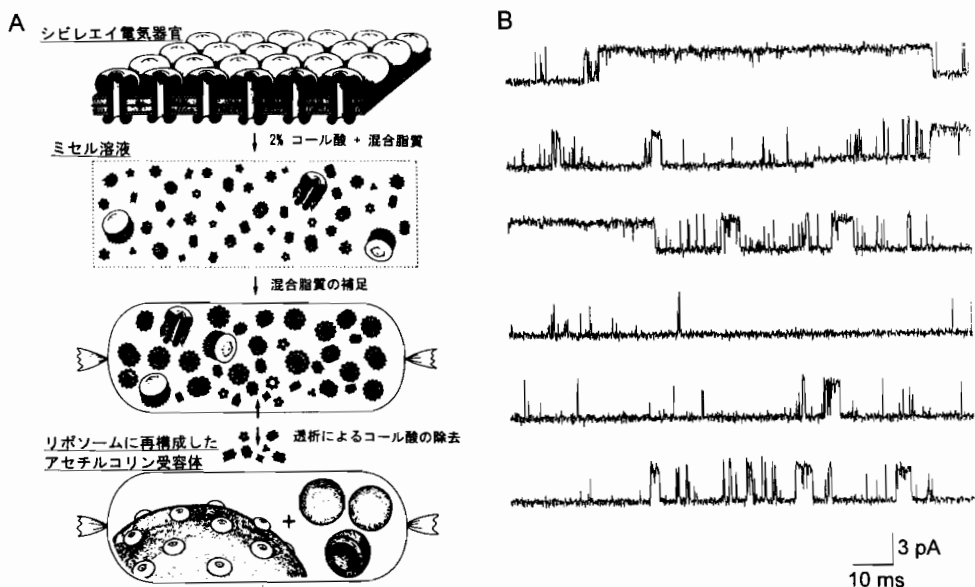


図17 ニコチン性アセチルコリン受容体

A. シビレイ、ニコチン性アセチルコリン受容体チャネル蛋白の精製。a. コール酸での可溶化。チャネルの疎水性領域に脂質や界面活性剤が結合している。b. 再構成に際してチャネル機能を保存するために高濃度の脂質を補う。c. 透析によりコール酸を除く。(Montalら⁴⁸⁾より改変)。B. 単一チャネル記録。ピペット内アセチルコリン濃度 $1 \mu\text{M}$ 、 500 mM NaCl 、 80 mV 。カットオフ周波数: 3 kHz 。 35 pS ⁵⁶⁾。

み、単層展開法によって受容体蛋白を気-液界面に移し、これをティップ=ディップ法で捉えて単一チャネル記録をおこなった(張り合わせティップ=ディップ法)⁵⁶⁾。単層展開法ではチャネルの配向がランダムであるが、ピペット内のみアセチルコリンを加えることによってリガンド結合部がピペット側に向けたもののみを電気的に捉えることができる。膜面積が小さ

い(1 μm^2 以下)ので速い現象も捉えることができた³⁷⁾。

C. チャネルデザイン

ニコチン性アセチルコリン受容体の一次構造がイオンチャネルでは初めて決定され⁵⁴⁾、膜を4回(M1~M4)貫通することが予想された。一方2次元結晶凍結標本からの電子線像から低

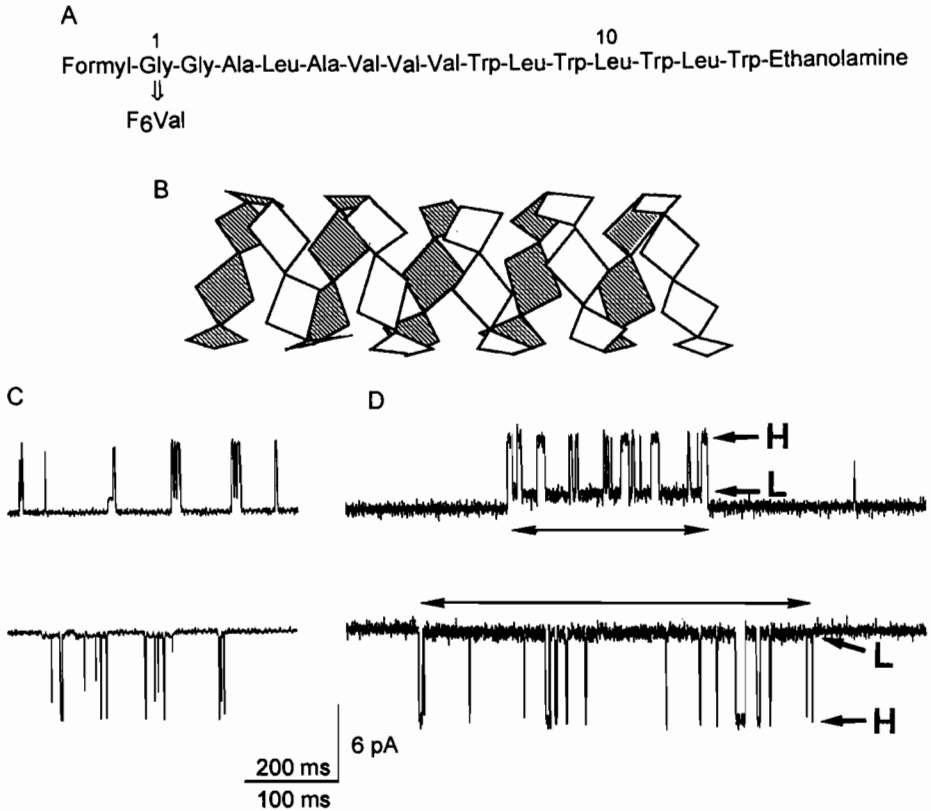


図18 電位依存性グラミシジンチャネル

A. グラミシジンAのアミノ酸配列。グリシン=グラミシジンAと第一残基を6フッ化バリンに置換した6フッ化バリン=グラミシジンA。B. グラミシジンチャネルのNMRから得られた3次元構造³⁵⁾の模式図。平行四辺形はアミド平面をあわらす。C. パンチアウト法によるチャネル記録。チェーンバーのcis側にグリシン=グラミシジンA, trans側に6フッ化バリン=グラミシジンAを加えると平面膜上にヘテロ二量体のチャネルが形成される。これをピペットでパンチアウトすると常に同一のオリエンテーションをもったチャネルを捉えられる。基線からの電流のジャンプは二量体の形成をあらわす。2つの異なるコンダクタンス状態をとる。グリシン=グラミシジンAから6フッ化バリン=グラミシジンAに流れる電流(上向きの方)の方が逆向きよりも小さい(整流性)。カットオフ周波数: 500 Hz, $\pm 300 \text{ mV}^{61)$ 。D. 改良ティップディップ法による高解像度チャネル記録。有機溶媒にヘキサデカンを使用することによって二量体持続時間(矢印であらわす)が伸び、二量体の構造変化によるゲーティング(H状態とL状態)がより明瞭に観察できる。H状態確率は電位依存性を示す。カットオフ周波数: 5 kHz, $\pm 300 \text{ mV}^{60)$ 。

分解能の3次元構造が明らかになってきた⁸⁷⁾。どの膜貫通領域がポアを形成するのか²⁾? 疎水性の最も高いM1と両親媒性のM2に相当するアミノ酸23残基のペプチドを合成した。気-液界面にペプチドを含んだリン脂質単分子層を形成し、これをティップ=ディップ法によって平面膜に再構成した(張り合わせティップ=ディップ法)。ネイティブなチャネルと同様のコンダクタンス、選択性、ゲーティングが観察された⁵⁸⁾。

このようなチャネル蛋白質工学⁵⁷⁾と呼ばれるアプローチは、チャネル分子内の機能単位(ポア・ゲート・センサーなどのパーツ)を組み立ててチャネル機能を再現するサブモレキュラーな再構成といえるだろう^{49,59)}。

ポアとしての性質だけでなく、電位依存性ゲート機構を持ったペプチドチャネルもデザインすることができた⁶⁰⁾。グラミシジンは短いペプチド(15アミノ酸残基: 図18A)¹⁾であるため半合成法によって非遺伝的アミノ酸によるア

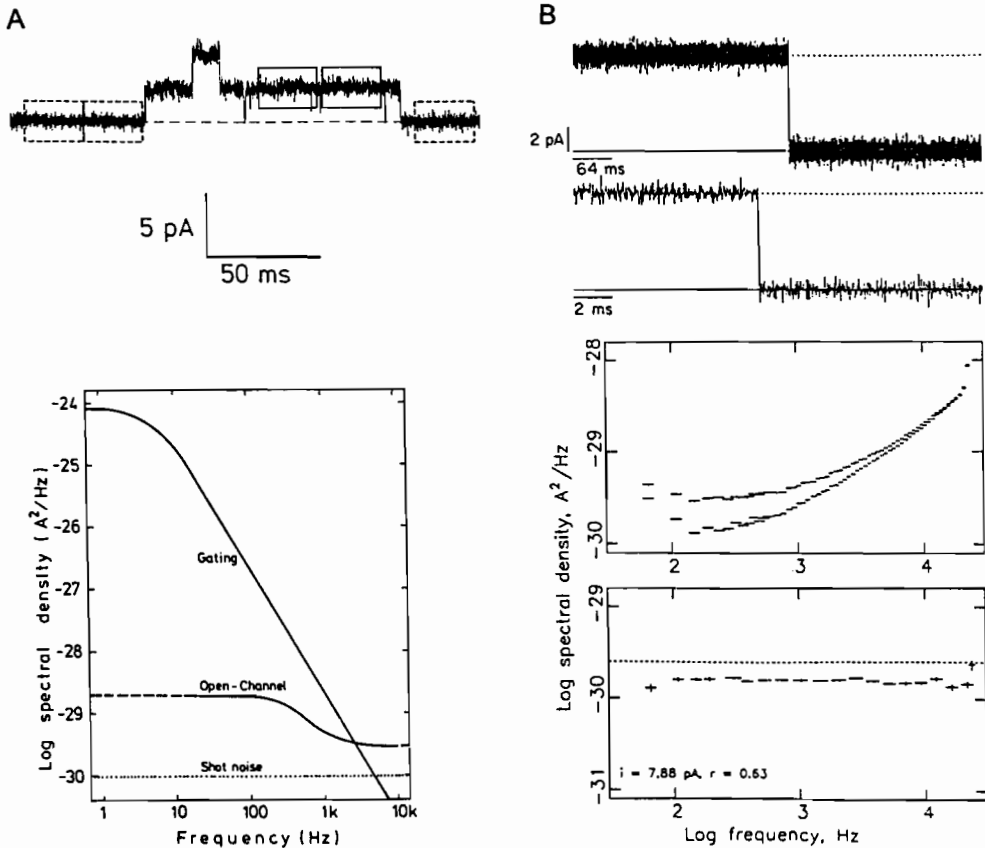


図19 オープンチャネルノイズ解析

A. ニコチン性アセチルコリン受容体のノイズ解析。上: 記録領域の選択とパワースペクトル密度。8 kHz 帯域で得られた原トレース。破線が閉状態を示す。破線の箱は閉状態、実線の箱は開状態のサンプルである。下: チャネル開閉のゲーティングノイズ・オープンチャネルノイズ・ショットノイズによるスペクトルの相対的關係。B. グラミシジンチャネルのオープンチャネルノイズ解析。上: 640 mM KCl での単一チャネル電流。実線: バックグラウンド, 点線: チャネル電流。チャネルが閉じる過程のトレースを2つの時間スケールで示した。0.04~20 kHz の記録帯域である。下: チャネル, バックグラウンドそれぞれのパワースペクトル密度と差スペクトル。点線はチャネル電流から予想されるショットノイズのレベル。(Sigworth⁷⁷⁾, Heineman & Sigworth²⁸⁾より改変)

ミノ酸置換も可能である。原子レベルの構造(図18B)が既知³⁵⁾であるのでゲーティングの分子機構を詳細に研究できる⁶²⁾。単一のアミノ酸置換によって電位非依存性のポアであったグラミシジンチャネルが、電位依存性ゲーティングと整流性を持つチャネルとなった。最小の電位依存性チャネルである。ヘテロ二量体のオリエンテーションと、ゲーティング・整流性との関係はパンチアウト法により決定した(図18C)⁶¹⁾。ミリ秒オーダーの構造変化は改良タイプ=ディップ法で記録できた(図18D)⁶⁴⁾。

ペプチド以外にもポリエチレンなどの素材を使った新しいチャネルのデザインが進められている³⁶⁾。

D. オープンチャネルノイズ解析

「単一チャネル法(パッチクランプ法)は、通常の生理学の世界を越えた化学物理の世界に足を踏み入れるに十分な威力を持っている(Hille³⁰⁾)」

単一チャネル記録はチャネル分子から見ると一分子のできごとだが、イオンの流れからみると多数のイオンの振る舞いを平均化した巨視的な現象である。開いたチャネルを輸送されるイオンによる電流のわずかなゆらぎからイオン輸送の本質的な過程を知ることができる。Sigworth⁷⁷⁾はオープンチャネルノイズ解析という新しい方法を開発した。従来巨視的電流に適用していたノイズ解析¹⁹⁾を単一チャネルのレベルに適用し、開状態と閉状態での電流のパワースペクトル密度の差からイオン透過過程に対する解析をおこなった(図19Aトレース)。1個のイオンが透過する過程はショットノイズで表現できる。

$$S(f) = 2iq \quad (13)$$

ただし、 $S(f)$:スペクトル密度、 i :単一チャネル電流、 q :輸送されるイオンの電荷。

ニコチン性アセチルコリン受容体に適用した例を通常の巨視的電流ノイズの結果と比較して図19Aに示した。チャネル開閉(ゲーティング)

によるノイズは大きく、ローレンツ型を示す。単一チャネル電流から予想されるショットノイズは点線で示す。マスキングという操作で構造変化に起因するノイズを除いた後でもオープンチャネルノイズはショットノイズの特性を示さない。通常の単一チャネル記録法では測定できない速いゲーティングが存在することが示唆された。

イオン透過過程をさらに深く追求するためにSigworthはこの方法をグラミシジンチャネルに適用した。最高の周波数帯域を得るために改良タイプ=ディップ法に相当する方法を使った。この場合、平坦な周波数特性を示したが、予想されるショットノイズよりも低い値をもつことがわかった。イオン透過過程をモデル解析することによって帯域を越えた100 nsのチャネルブロック現象を推定することができた²⁸⁾。

IV. 今後の展望

パッチクランプ法による細胞膜上のチャネルに対する広範で深い研究成果に比べれば、細胞小器官上のチャネルはまだ未開拓である。細胞内情報伝達とコンパートメント間物質輸送に関わる新しいチャネルが今後も続々と発見されるであろう^{33,42,82)}。最近、チャネル蛋白を精製するための機能アッセイ法として平面膜が使われた³²⁾。脂質平面膜法はこれらのチャネルをクローニングの際にも不可欠な方法である。

技術的にはこの数年間のうちに平面膜法において大きな進歩があった。平面膜法の長期的で大きな課題はやはりチャネルの組込みに関わることである。平面膜で電位依存性チャネルの巨視的振る舞いを記録した例は極めてまれである。同一の膜配向を持ったチャネル蛋白を小さな膜面積に大量に組み込むことが必要である。ナスタチン法を越えるような迅速に、効果的に膜蛋白を組み込む方法の開発が望まれる。これによって巨視的レベルで過渡的な電位依存性活性化過程やゲート電流を捉えることができるであろう。

単一チャネル記録が Bean^ら⁷⁾によって初め

て成功してからすでに25年になる。単一チャネル電流記録の先にあるものは何か？可能性の地平を拓くものの一例としてオープンチャネル電流ノイズ解析を挙げた。これはイオン透過過程におけるイオンとチャネル蛋白との相互作用をマイクロ秒以下の領域にまでひろげた。まさに単一イオン電流のレベルに達しようとしているのである。イオンの透過だけでなく、中性透過物質の輸送過程も単一チャネルレベルで解析が可能になってきた^{11,66)}。単一ゲート電流を目指したゲート電流ノイズ解析⁷⁵⁾も今後有望である。

イオンチャネルの構造と機能の関係を明らかにする上で脂質平面膜法は今後もユニークな情報を提供してくれるであろう。

謝辞

平面膜の化学と物理の世界に導いていただいた M. Montal 教授と O. S. Andersen 教授、チェンバー、ファラデイボックスなどを作製していただいた深尾昌弘氏、小原正裕氏、協同研究者の山本隆博士、Sabirov Ravshan 博士、山口宣秀博士、発表の機会をいただき御校閲いただいた岡田泰伸教授、以上の方々に深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) Andersen, O. S. (1984) Gramicidin channels. *Annu. Rev. Physiol.* **46**, 531-548
- 2) Andersen, O. S. & Koeppe, R. E. II (1992) Molecular determinants of channel function. *Physiol. Rev.* **72**, S 89-S 158
- 3) Andersen, O. S. & Muller, J. (1982) Monazomycin-induced single channels. I. Characterization of the elementary conductance events. *J. Gen. Physiol.* **80**, 403-426
- 4) Anzai, K., Takano, C., Tanaka, K. & Kirino, Y. (1994) Asymmetrical lipid charge changes the subconducting state of the potassium channel from sarcoplasmic reticulum. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* **199**, 1081-1087
- 5) Armstrong, C. M. & Gilly, W. F. (1992) Access resistance and space clamp problems associated with whole-cell patch clamping. *Methods Enzymol.* **207**, 100-122
- 6) Barrantes, F. J. (1993) Structural-functional correlates of the nicotinic acetylcholine receptor and its lipid microenvironment. *FASEB J.* **7**, 1460-1467
- 7) Bean, R. C., Shepherd W. C., Chan, H. & Eichner J. (1969) Discrete conductance fluctuations in lipid bilayer protein membranes. *J. Gen. Physiol.* **53**, 741-757
- 8) Bendat J. S. & Piersol, A. G. (1986) Random data. Analysis and measurement procedures. 2nd Ed. Wiley Interscience, New York
- 9) Berti, A., Blumwald, E., Coronado, R., Eisenberg, R., Findlay, G., Gradmann, D., Hille, B., Koehler, K., Kolb, H.-A., MacRobbie, E., Meissner, G., Miller, C., Neher, E., Palade, P. (1992) Electrical measurements on endomembranes. *Science* **258**, 873
- 10) Bezanilla, F. (1985) A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder. *Biophys. J.* **47**, 437-441
- 11) Bezrukov, S. M., Vodyanov, I. & Parsegian, V. A. (1994) Counting polymer moving through a single ion channel. *Nature* **370**, 279-281
- 12) Boheim, G., Hanke, W. & Eibl, H. (1980) Lipid phase transition in planar bilayer membrane and its effect on carrier- and pore-mediated transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**, 3403-3407
- 13) Bretscher, M. S. & Munro, S. (1993) Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, **261**, 1280-1281
- 14) Chak, A. & Karlin, A. (1992) Purification and reconstitution of nicotinic acetylcholine receptor. *Methods Enzymol.* **207**, 546-555.
- 15) Cohen, F. & Niles, W. (1993) Reconstituting channels into planar membranes: A conceptual framework and methods for fusing vesicles to planar bilayer phospholipid membranes. *Methods Enzymol.* **220**, 50-68
- 16) Coronado, R. & Latorre R. (1983) Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. *Biophys. J.* **43**, 231-236
- 17) Coronado, R., Morrissette, J., Sukhareva, M. & Vaughan, D. M. (1994) Structure and function of ryanodine receptors. *Am. J. Physiol.* **266**, C 1485-C 1504
- 18) Craig, E. A. (1993) Chaperones: Helpers along the pathways to protein folding. *Science* **260**, 1902-1903
- 19) DeFelice, L. J. (1981) Introduction to membrane noise. Plenum, New York
- 20) Ehrlich, B. (1992) Planar lipid bilayers on patch pipettes: Bilayer formation and ion channel incorporation. *Methods Enzymol.* **207**, 463-470
- 21) Finkelstein, A. (1987) Water movement through lipid bilayers, pores and plasma membranes. Theory and reality. John Wiley & Sons, New York
- 22) Gambale, F., Rauch, G., Belmonte, G. & Menestrina, G. (1992) Properties of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A ionic channel incorporated in planar lipid bilayers. *FEBS Lett.* **306**, 41-45
- 23) Gilmore, R. (1993) Protein translocation across

- the endoplasmic reticulaum: A tunnel with toll booths at entry and exit. *Cell* **75**, 589-592
- 24) Green, W. N. & Andersen, O. S. (1991) Surface charges and ion channel function. *Annu. Rev. Physiol.* **53**, 341-359
- 25) Gruner, S. M., Cullis, P. R., Hope, M. J. & Tilcock, P. S. (1985) Lipid polymorphism: The molecular basis of nonbilayer phases. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **14**, 211-238
- 26) Hanke, W. & Schlue, W.-R. (1993) Planar Lipid Bilayers. Methods and Applications. Academic Press, London
- 27) Hartshorne, R. P., Tamkun, M. & Montal, M. (1986) The reconstituted sodium channel from brain. In: Miller, C. Ion channel reconstitution. Plenum, New York.
- 28) Heinemann, S. H & Sigworth, F. J. (1988) Open channel noise IV. Estimation of rapid kinetics of formamide block in gramicidin A channels. *Biophys. J.* **54**, 757-764
- 29) Helm, C. A. & Israelachvili, J. N. (1993) Forces between phospholipid bilayers and relationship to membrane fusion. *Methods Enzymol.* **220**, 130-143
- 30) Hille, B. (1992) Ion channels of excitable membranes, 2nd Ed. Sinauer Associates Inc. Sunderland, MA
- 31) 平田 肇, 浜本敏郎 (1994) 平面膜. 日本膜学会編 膜学実験シリーズ, 第 I 巻生体膜編, 共立出版, 東京
- 32) Ide, T., Morita, T., Kawasaki, T., Taguchi, T. & Kasai, M. (1991) Purification of a K^+ -channel protein of sarcoplasmic reticulum by assaying the channel activity in the planar lipid bilayer system. *Biochem. Biophys. Acta* **1067**, 213-230
- 33) Kamata, H., Hirata, M., Ozaki, S., Kusaka, I., Kagawa, Y. & Hirata, H. (1992) Partial purification and reconstitution of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ Ca^{2+} channel of bovine liver microsomes. *J. Biochem.* **111**, 546-552
- 34) Kates, M. (1972) 山川民夫, 斎藤国彦, 林陽 訳, 脂質研究法, 東京化学同人
- 35) Ketchum, R.R., Hu, W. & Cross, T. A. (1993) High-resolution conformation of gramicidin A in a lipid bilayer by solid-state NMR. *Science*, **261**, 1457-1460
- 36) Kobuke, Y., Ueda, K. & Sokabe M. (1992) Artificial non-peptide single ion channels. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 7618-7622
- 37) Krasilnikov, O. V. & Sabirov, R. Z. (1992) Comparative analysis of latrotoxin channels of different conductance in planar lipid bilayers. Evidence for cluster organization. *Biochim. Biophys. Acta* **1112**, 124-128
- 38) Labarca, P. & Latorre, R. (1992) Insertion of ion channels into planar lipid bilayers by vesicle fusion. *Methods Enzymol.* **207**, 447-463
- 39) Latorre, R. & Alvarez, O. (1981) Voltage-dependent channels in planar lipid bilayer membranes. *Physiol. Rev.* **61**, 77-150
- 40) Latorre, R., Labarca, P. & Naranjo, D. (1992) Surface charge effects on ion conduction. *Methods Enzymol.* **207**, 471-501
- 41) Lakshminarayanaiah, N. (1984) Equations of membrane biophysics. Academic press, Orlando.
- 42) Maeda, N., Kawasaki, T., Nakade, S., Yokota, N., Taguchi, T., Kasai, M. & Mikoshiba, K. (1991) Structural and functional characterization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channel from mouse cerebellum. *J. Biol. Chem.* **266**, 1109-1116
- 43) Melnick, J., Dul, J. L. & Argon, Y. (1994) Sequential interaction of the chaperones BiP and GRP94 with immunoglobulin chains in the endoplasmic reticulum. *Nature* **370**, 373-375
- 44) Miller, C. & Racker, E. (1976) Calcium-induced fusion of fragmented sarcoplasmic reticulum with artificial planar bilayers. *J. Membr. Biol.* **30**, 283-300
- 45) Miller, C. Ed. (1986) Ion channel reconstitution. Plenum, New York.
- 46) Monck, J. R. & Fernandez, J. M. (1994) The exocytotic fusion pore and neurotransmitter release. *Neuron* **12**, 707-716
- 47) Montal, M. & Mueller, P. (1972) Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 3561-3566
- 48) Montal, M., Anholt, R. & Labarca, P. (1986) The reconstituted acetylcholine receptor. In: Miller, C. Ed. Ion channel reconstitution. Plenum, New York
- 49) Montal, M. O., Iwamoto, T., Tomich, J. M. & Montal, M. (1993) Design, synthesis and functional characterization of a pentameric channel protein that mimics the presumed pore structure of the nicotinic cholinergic receptor. *FEBS Lett.* **320**, 261-266
- 50) Montal, M. (1987) Reconstitution of channel proteins from excitable cells in planar lipid bilayer membranes. *J. Membrane Biol.* **98**, 101-115
- 51) Mueller, P. Rudin, D. O., Tien, H. T. & Wescott, W. C. (1962) Reconstitution of excitable cell membrane structure in vitro. *Circulation* **26**, 1167-1171
- 52) New, R. R. C. Ed. (1990) Liposomes: a practical approach. IRL Press, Oxford.
- 53) Niles, W. D. Levis, R. A. & Cohen F. S. (1988) Planar bilayer membranes made from phospholipid monolayers form by a thinning process. *Biophys. J.* **53**, 327-335
- 54) Noda, M., Takahashi, H., Tanabe, T., Toyosato, M., Kikuyotani, S., Furutani, Y., Hirose, T., Takashima, H., Inayama, S., Miyata, T. & Numa, S. (1983) Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature*, **302**,

- 528-532
- 55) Ohki, S. (1993) Fusion of spherical membranes. *Methods Enzymol.* **220**, 79-89
- 56) Oiki, S. & Montal, M. (未発表データ)
- 57) Oiki, S., Danho, W. & Montal, M. (1988) Channel protein engineering: Synthetic 22-mer peptide from the primary structure of the voltage-sensitive sodium channel forms ionic channels in lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2393-2397
- 58) Oiki, S., Danho, W., Madison, V. & Montal, M. (1988) M2 δ , a candidate for the structure lining the ionic channel of the nicotinic cholinergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 2393-2397
- 59) 老木成稔 (1991) ペプチドによるイオンチャネル機能の再構成—アセチルコリン受容体ポアの構造と機能. *膜*, **16**, 284-294
- 60) Oiki, S., Koeppe II, R. E. & Andersen, O. S. (1992) A dipolar amino acid substitution induces voltage-dependent transitions between two stable conductance states in gramicidin channels. *Biophys. J.*, **62**, 28-30
- 61) Oiki, S., Koeppe II, R. E. & Andersen, O. S. (1994) Asymmetric gramicidin channels: Heterodimeric channels with a single F₆Val¹ residue. *Biophys. J.*, **66**, 1823-1832
- 62) 老木成稔 (1994) ポアからゲートへ—電位依存性チャネルの分子機構— *ブレインサイエンス*, **5**, 157-166
- 63) Oiki, S., Koeppe II, R. E. & Andersen, O. S. Voltage-dependent gramicidin channels. Sokabe, M., Auerbach, A. & Sigworth, F.J. Eds., "Progress in Cell Research: Molecular Biophysics of Ion Channels", Elsevier, Amsterdam (in press)
- 64) Oiki, S., Koeppe II, R. E. & Andersen, O. S. (1995) Voltage-dependent gating of an asymmetric gramicidin channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2121-2125
- 65) Redwood, W. R., Pfeiffer, F. R., Weisbach, J. A. & Thompson, T. E. (1971) Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane. *Biochim. Biophys. Acta* **233**, 1-6
- 66) Sabirov, R. Z. Krasilnikov, O. V., Ternovsky, V. I. & Merzliak, P. G. (1993) Relation between ionic channel conductance and conductivity of media containing different nonelectrolytes. A novel method of pore size determination. *Gen. Physiol. Biophys.*, **12**, 95-111
- 67) Sawyer, D. B., Koeppe II, R. E. & Andersen, O. S. (1989) Induction of conductance heterogeneity in gramicidin channels. *Biochemistry* **28**, 6571-6583
- 68) Sawyer, D. B., Oiki, S. & Andersen, O.S. (1990) Single channels formed by gramicidin A in "solvent-free" bilayers formed from surface monolayers using a tip-dip technique. *Biophys. J.* **57**, 100 a
- 69) Schuerholz, T. & Schindler, H. (1983) Formation of lipid-protein bilayers by micropipette-guided contact of two monolayers. *FEBS Lett.* **152**, 187-190
- 70) Shennan, D. B., Davis, B. & Boyd, C. A. R. (1986) Chloride transport in human placental microvillous membrane vesicles. I. Evidence for anion exchange. *Pflugers Arch.* **406**, 60-64
- 71) Sherman-Gold, R. Ed. (1993) The Axon guide for electrophysiology and biophysics laboratory techniques. Axon, Foster City.
- 72) Sherwood, D. & Montal, M. (1975) Transmembrane lipid migration in planar asymmetric bilayer membranes. *Biophys. J.* **15**, 417-434
- 73) 高崎久仁子, 曾我部正博 (1994) イオンチャネル. 日本膜学会編 膜学実験シリーズ, 第 I 巻生体膜編, 共立出版, 東京
- 74) Shin, Y.-K., Levinthal, C., Levinthal, F. & Hubbell, W. L. (1993) Colicin E1 binding to membranes: Time-resolved studies of spin-labeled mutants. *Science* **259**, 960-963
- 75) Sigg, D., Stefani, E & Bezannilla F. (1994) Gating current noise produced by elementary transitions in Shaker potassium channels. *Science* **264**, 578-582
- 76) Sigworth, F. J. (1983) Electronic design of the patch clamp. In Sakmann, B. & Neher, E. (Eds.) Single-channel recording. Plenum, New York.
- 77) Sigworth, F. J. (1985) Open channel noise. I. Noise in acetylcholine receptor currents suggests conformational fluctuations. *Biophys. J.* **47**, 709-720
- 78) Silverstein, T. P. et al. (1993) Transmembrane measurements across bioenergetic membranes. *Biochim Biophys Acta* **1183**, 1-3
- 79) Silvius, J. R. (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 323-348
- 80) Simon, S. M. & Blobel, G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* **65**, 371-380
- 81) Small, D. M. (1986) The physical chemistry of lipids. From alkanes to phospholipids. Plenum, New York.
- 82) Sokabe, M., Kasai, M., Nomura, K. & Naruse, K. (1991) Electrophysiological analysis of structural aspects of voltage-dependent SR K⁺ channel. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **98**, 23-30
- 83) Suarez-Isla, B. A., Wan, K., Lindstrom, J. & Montal, M. (1983) Single-channel recordings from purified acetylcholine receptors reconstituted in bilayers formed at the tip of patch pipettes. *Biochemistry* **22**, 2319-2323
- 84) Takagi, M., Azuma, K. & Kishimoto, U. (1965) A new method for the formation of bilayer membranes in aqueous solution. *Annu. Rep. Biol.*

- Works Fac. Sci. Osaka Univ. **13**, 107-110
- 85) Tanford, C. (1980) 妹尾学, 豊島善則 訳, 疎水性効果, ミセルと生体膜の形成, 共立出版
- 86) Thomas, L., Blachly-Dyson, E., Colombini, M. & Forte, M. (1993) Mapping of residues forming the voltage sensor of the voltage-dependent anion-selective channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 5446-5449
- 87) Unwin, N. (1993) Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution, *J. Mol. Biol.* **229**, 1101-1124
- 88) Venable, R. M., Zhang, Y., Hardy, B. J. & Pastor, R. W. (1993) Molecular dynamics simulations of a lipid bilayer and of hexadecane: An investigation of membrane fluidity. *Science* **262**, 223-226
- 89) White, S. H. (1986) The physical nature of planar bilayer membranes. In: Miller, C. Ed. *Ion channel reconstitution*. Plenum, New York.
- 90) Wonderlin, W. F., Finkel, A. & French, R. J. (1990) Optimizing planar lipid bilayer single-channel recordings for high resolution with rapid voltage steps. *Biophys. J.* **58**, 289-297
- 91) Woodbury D. J. & Miller, C. (1990) Nystatin-induced liposome fusion: A versatile approach to ion channel reconstitution into planar bilayers. *Biophys. J.* **58**, 833-839
- 92) Yamamoto, T., Kashihara, Y., Okada, Y. & Oiki, S. (1994) Translocating pathway of nascent polypeptide chain in endoplasmic reticulum: Analysis in planar lipid bilayer system. *Jpn. J. Physiol.* **44**, S159
- 93) Zasadzinski, J. A., Viswanathan, R., Madsen, L., Garnaes, J. & Schwartz, D. K. (1994) Langmuir-Blodgett films. *Science* **263**, 1726-1733