

ポンプおよびトランスポーター電流解析法

木村純子

(福島県立医科大学薬理学講座)

はじめに

起電性の膜輸送担体である、Na-K ポンプや Na-Ca 交換によって起こる膜電流のホールセルクランプ測定法は、手技的にはチャンネル電流の測定法とほとんど変わらない。ただ異なる点は、ホールセルクランプ法でチャンネル電流にしばしばみられるようなチャンネルの開閉に起因するノイズが現れない事、従って、シングルチャンネル記録にあたるシングル担体輸送記録が難しいこと、電流の逆転電位の計算が単一のネルンストの式から求められない事などであろう。イオンチャンネルと担体輸送の最も違う点は、前者では、イオンが濃度勾配に従って流れるのに対して、後者では、濃度勾配に逆らう流れが可能なことである。ここでは与えられた表題の順序に逆らって、トランスポーター電流の Na-Ca 交換電流から説明する。

I. Na-Ca 交換電流^{1,2)}

Na-Ca 交換は心筋では、交換比が 3Na : 1Ca である。網膜の視細胞にはこれとは異なる Na-Ca 交換が発見され、その交換比は 4Na : (1Ca + 1K) でやはり起電性である³⁾。以下にモルモット心室筋の交換電流の実験例を示す。心筋の Na-Ca 交換は両方行性なので、内向き交換電流 (Ca を細胞内から外へ追い出す方向) としても、外向き電流 (Ca を細胞内へ流入させる方向) として、あるいは、逆転電位をはさんで両方の電流が見えるモードで測定することもできる。

A. 内向き Na-Ca 交換電流

細胞内に Ca を負荷し、細胞外に Na を作用

させると、3 個の Na が細胞内へ流入するかわりに、一個の Ca が細胞外へ追い出されるので、差引一個のプラスチャージである Na の流れが電流として記録できる。これが内向き交換電流である。図 1 は、その実験の一例である。電極内液の遊離 Ca 濃度は、570nM (pCa 6.24) で、これは、BAPTA 20mM と CaCl₂ 16mM を組み合わせて計算し、得られる濃度である。(この計算方法は文献^{4,5)}、BAPTA の結合定数については、⁶⁾を参照されたい。) 細胞外液、電極内液の組成は、図の説明に記す。

図 1A のように、ホールセルクランプを開始すると、まず -60mV の保持電位での電流が

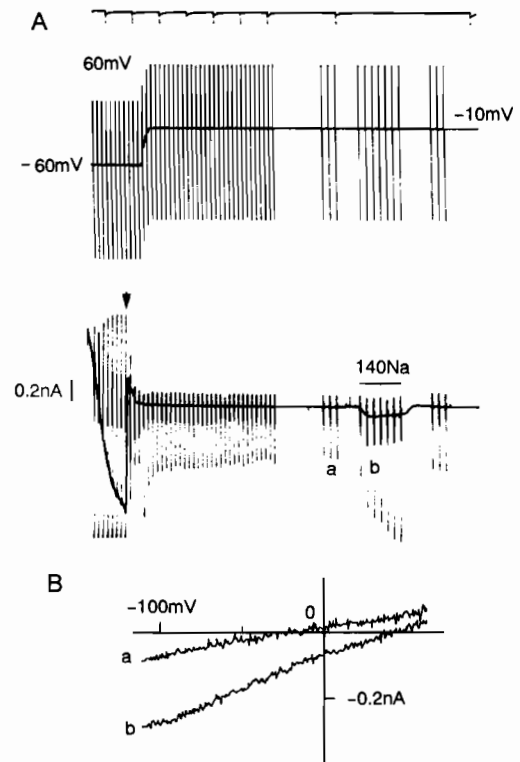


図1. ホールセルクランプ開始から内向き Na-Ca 交換電流の測定までを示す。A: 一番上の線は、時間表示で、1区間1分である。途中から記録紙の送りを速めている。真ん中が電圧、一番下が電流記録。保持電位は、最初 -60mV 。細胞外液をタイロッド液から Li 液に変えてから (矢印), 保持電位を -10mV にした。電流電圧曲線を得る為に、ランプ波 (三角波) を、最初は10秒毎に、交換電流の測定前後は、3秒毎にかけている。ランプ波の大きさは、保持電位から、まず+側に 70mV 、次に-側に 180mV 、最後に+側に 110mV でもとの保持電位にもどる。速度は常に一定で $180\text{mV}/250\text{ms}$ である。電流記録を見ると、最初に電流が急速に外向きから内向きに変化している。この部分は、ホールセル状態になったばかりの時、細胞内に電極内液 (Cs液) が拡散し、細胞内の K イオンが減少して、Cs イオンに置き変わっていく過程である。内向き整流性 K 電流 (i_{K1}) が、 -60mV で外向きだったのが、細胞内 K の減少とともに、内向きになっていくのである。この現象が定常状態になったら、まず細胞外液を Li 液に変える (矢印) と、 i_{K1} の内向き成分がなくなるため、電流は急に小さくなる。残っている電流は背景電流と呼ばれるものである。 -10mV で、細胞内 Ca 濃度が定常状態になった頃、外液を Li 液から、Na 液に短時間 (この場合は18秒間) 変える。すると、内向きの Na-Ca 交換電流が現れる。B: A の電流記録の a と b の電流電圧曲線を描いたもの。a がコントロール (Li 外液中), b が Na 外液中。これらの差が交換電流成分である。

液の組成 (mM):

タイロッド液 NaCl 140, KCl 5.4, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1, NaH_2PO_4 0.3, glucose 5, HEPES 5, (pH 7.4).

Li 外液 LiCl 140, CaCl_2 1, MgCl_2 1, HEPES 5 (pH 7.2), ouabain 0.02, verapamil 0.002, ryanodine 0.002.

Na 外液 NaCl 140, CaCl_2 1, MgCl_2 1, HEPES 5 (pH 7.2), ouabain 0.02, Verapamil 0.002, ryanodine 0.002.

Cs 内液 CsCl 30, CsOH 90, Aspartic acid 50, MgCl_2 3, MgATP 5, K_2CrP 5, BAPTA 20, CaCl_2 16 (pCa 6.24), HEPES 20 (pH 7.2).

外向きから内向きに変わる。これは、細胞内の K イオンが Cs イオンに置き変わる過程を表している。この時間が速いほど、電極内から細胞内へのアクセスが良いと考えられる。電極内の遊離 Ca 濃度がこの実験の様に比較的高いときは、保持電位を負側に深くしないと細胞が動き出してしまふ。K イオンが Cs に置き変わったら、細胞外液を普通のタイロッド液から、交換電流以外の電流を抑制するための細胞外液、即ち、Ca チャンネル抑制薬 (ここでは、verapamil $2\mu\text{M}$) と Na-K ポンプ抑制薬 (ouabain $20\mu\text{M}$) の入った無 K, 140mM Li 液にする。外

液を変えると同時に保持電位を変える。保持電位は、どこでも良いと思うが、この場合は、 -10mV にした。しばらくして (5—10分後)、細胞内の Ca 濃度が一定になった頃合いを見計らって、細胞外液を、Li 液から Na 液に変える。すると、保持電流が内向きに移動し、三角波による電圧変化に対応する電流の、負側への振れが大きくなる。内向きの交換電流が発生したのである。このときの電流電圧曲線をコントロールと比較すると、図1Bのようになる。電流は、どの電位でもコントロールより内向きで、負の電位に深くなるほど、大きくなる。これが交換電流かどうかを確かめるには、Ni や Mn, La 等の金属イオンで抑制されるかどうかをみればよい。特異的ではないが、dichlorobenzamil 等の amiloride 誘導体が Na-Ca 交換を抑制することが知られている⁷⁾。また、最近米国の Philipson 等の作りだした、Na-Ca 交換の特異的抑制ペプチド XIP⁸⁾ を細胞内に負荷し、電流が発生しないことを確かめるのもよいであろう。

B. 外向き Na-Ca 交換電流

外向き交換電流は、細胞内に Na を負荷し、細胞外に Ca を作用させると出現する。図2はその実験例で、ホールセルクランプを開始した時点からの記録である。始めの細胞外液は Ca 無しのタイロッド液である。Ca があると電極内から拡散する Na と、細胞外 Ca の交換が起きてしまい、流入する Ca で細胞が収縮してしまふ。このときは、細胞内の Ca 濃度は 140nM と低いので、最初から、保持電位を -10mV にしておいて良い。細胞内 Ca が 0 だと Na-Ca 交換は活性化されないので、細胞内 Ca は必須である。まず、細胞内の K イオンが Cs イオンに置き変わり、電流が定常状態に達したら、細胞外液を Ca チャンネル抑制薬 (verapamil $2\mu\text{M}$)、Na-K ポンプ抑制薬 (ouabain $20\mu\text{M}$) 入りの外液 (140mM Na 液) に変える。しばらくして (5—10分後)、細胞内 Na 濃度が一定になった頃、細胞外液をできるだけ速く Ca 入りの外液に変える。細胞外 Ca によって、顕著な

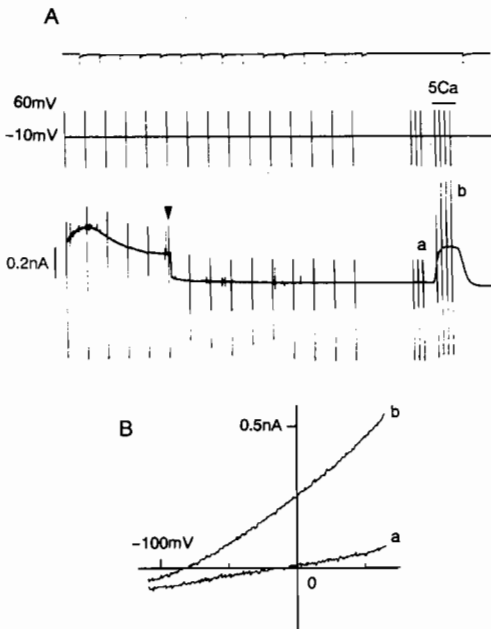


図2. 外向き Na-Ca 交換電流の測定. 図1と同様に一番上が時間 (1区画1分間), 真ん中が電圧, 下が電流記録. Ca 無しのタイロッド外液中で, ホールセルクランプを開始した. 電極内液には, 20mM の Na が入っている. 電極内液が細胞内に拡散する過程で, 保持電位 -10mV の電流が一過性に外向きに大きくなり, 次第に小さくなる. 定常状態になった所で, 外液を Ca 無しの Na 外液に変える (矢印). 細胞内液の Ca が拡散するのを待って, 細胞外液の Ca を 0 から 5mM にすると, 外向きの交換電流が発生した. (b)

B. A の a (コントロール) と b (5mM Ca) の電流電圧曲線. Na-Ca 交換電流 (b) は, コントロールに比べ, どの電圧でも外向きである.

液の組成:

無 Ca タイロッド液, 図1のタイロッド液から CaCl_2 を除いたもの.

Na 外液, 図1の Na 外液から CaCl_2 を除いた液 (コントロール) と, 5mM 入った液.

電極内液, NaCl 20, CsOH 90, Aspartic acid 40, MgATP 5, MgCl_2 3, K_2CrP 5, BAPTA 20, CaCl_2 10 (pCa 6.85), HEPES 20 (pH7.2).

外向き電流が発生する (b). この時, 三角波で, 電流電圧曲線を記録すると, 図2Bのようになる. Ca 入り外液中での電流は, コントロールに比べ, すべての電位で外向きで, 陽極側に行くほど電流は大きい. この新たに発生した電流成分が, Na-Ca 交換電流である.

C. 両方向の交換電流の測定法

Na-Ca 交換電流の逆転電位 (E_{NaCa}) は, 次の式で表される.

$$E_{\text{NaCa}} = 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{Ca}}$$

E_{Na} , および, E_{Ca} はそれぞれ Na, Ca イオンの平衡電位である. この式を使って計算してみると, たとえば, Ca が細胞内 250nM, 細胞外 1mM, Na が細胞内 20mM, 細胞外 140mM の時, 交換電流の逆転電位は, -68mV である. 逆転電位を保持電位にすると, そこでは交換電流が流れないので, 細胞内の遊離 Ca や Na 濃度を一定に保つことができる. この方法で行った実験の文献は, ^{9,10)} 等である. なお交換電流は温度に敏感で²⁾, 温度が変わると, 大きさも変わるので, 定量的な実験には, 灌流液の温度管理が大切である.

D. ジャイアントパッチ法による交換電流

ホールセルクランプ法では, 細胞内環境を調節しようとする時, 細かい点で制約がある. そこで, 米国テキサス大学の D. Hilgemann は, Na-Ca 交換電流を測定する際, 膜内測の環境を自在にコントロールするための新しい方法を考案した. 彼は, 心筋細胞を一晩, 低 Cl 高 K 溶液中に放置し, 細胞膜を局所的に細胞骨格から遊離させた. その風船状になった膜にパッチを試み, 直径 $20\mu\text{m}$ のガラス電極で巨大膜セルフリーパッチを作り, 交換電流の記録に成功した. この方法については, ^{11,12)} の文献を参照されたい.

II. Na-K ポンプ電流^{13,14)}

Na-K ポンプ電流は, 細胞内 Na と細胞外 K イオンが 3:2 の比で交換することによって生じる電流で, その主なエネルギー源は, 一回転あたり一個の ATP の加水分解である.

Na-K ポンプ電流の逆転電位 (E_{NaK}) は, 次の式で求められる¹⁴⁾.

$$E_{\text{NaK}} = E_{\text{ATP}} + 3E_{\text{Na}} - 2E_{\text{K}}$$

ATP の分解による E_{ATP} は -600mV である¹⁴⁾. 従って, 生理的条件では E_{NaK} は -200mV

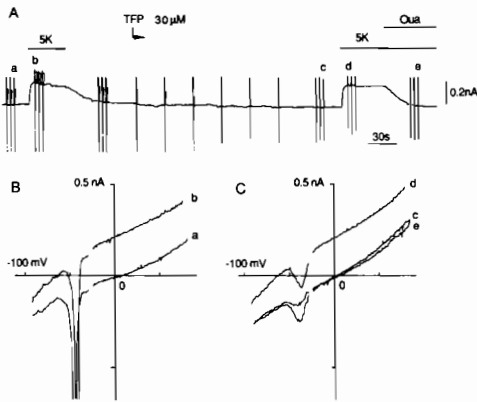


図3. Na-K ポンプ電流の実験の一例。ここでは、Na-K ポンプ電流に対して、カルモジュリン阻害薬の trifluoperazine (TFP) が作用しないことを示している。ポンプ電流は、30mMNa を含む電極内液で細胞を灌流しておき、細胞外のK濃度を0 (図3Aa) から5 mM (b) に高めることによって発生させた。次いで、TEP を含む細胞外液に変え (矢印)、もう一度、細胞外液に5 mM K を与えると、前と同じ大きさのポンプ電流が発生した (図3Ac と d)。ポンプ電流の発生中にその特異的阻害薬である ouabain 20 μ M を細胞外に灌流すると、電流は抑制され、コントロールとほぼ同じになってしまう (e)。B: A の a と b の電流電圧曲線を描いたもの。これは、ランプ波の上行脚の電流なので、-50mV 付近に、Na チャンネル電流が、一過性の内向き電流として現れている。これに対し、図1と図2の電流電圧曲線は、どれもランプ波の下行脚のため、Na 電流は不活化して見えない。C: TEP は、Na 電流を抑制するが、ポンプ電流は抑制しない。c (コントロール)、d (5 mM K 外液)、e (20 μ M ouabain 存在下) は、A の同じ記号の電流と対応する。

液の組成:

細胞外液 (無Ca, K (±) タイロド液)

NaCl 144, NaH₂PO₄ 0.3, MgCl₂ 1.3, glucose 5, HEPES 5 (pH 7.2), BaCl₂ 1, verapamil 0.002, KCl (0 or 5)

細胞内液

CsOH 70, Aspartic acid 70, NaOH 30, MgATP 10, K₂CrP 5, MgCl₂ 3, NaH₂PO₄ 1, TEACl 20, EGTA 5, HEPES 5 (pH 7.2).

より負の値になる。

図3は、モルモット心室筋でポンプ電流を出現させた実験の一例である。まず、電極液に30mMNa を入れ、ホールセルモードにする。この時、細胞外液は、K無しにしておき、ポンプ電流が発生しないようにする。また、Ca も無くしておき、Na-Ca 交換が起きないようにする。3—5分後、細胞の隅々まで、Na イオ

ンが行き渡って、電極内と細胞内の濃度が平衡に達した頃、細胞外にKを流す。すると、図にみえるように、外向き電流が発生する。この電流は、図のeに示すように、ouabainで抑制されるので、ポンプ電流であることが確認できる。ポンプ電流の場合も Na-Ca 交換電流の場合も同じであるが、定量的な実験をする場合は、電極内液が細胞内によく拡散しなければならない。その一つの目安として、ホールセルクランプのはじめにどのくらいのスピードで、細胞内のKイオンとCsイオンが置き変わるかを確かめるとよい。時には、置き変わるスピードがひどく遅い事がある。このようなときは、パッチ膜の穴のあき具合に問題があるだろうから、その細胞はいさぎよくあきらめたほうがよい。心筋の場合、なるべく形が単純で、比較的小さい細胞を使うのが、細胞内と電極内液のイオン濃度を早く平衡状態にし、一定に保つ目的には適していると思う。なお電流電圧曲線の図で、Na-Ca 交換には、ランプ波形の下行脚に当たる部分を、Na-K ポンプ電流の図では、ランプ波形の上行脚に当たる部分を用いた。この違いは、下行脚では、Na チャンネル電流が見えないが、上行脚では見えるところに現れている。これについての詳しい説明は、文献¹⁵⁾の方法を参照されたい。

おわりに

定常状態の Na-Ca 交換電流や Na-K ポンプ電流の測定方法を述べたが、この方法に他の方法を組み合わせたり、いろいろな工夫をこらして、担体の性質の解析が進んでいる。例を上げれば、細胞内のケージド Ca を光で瞬時に放出して、Na-Ca 交換電流の一過性の動きから、担体の回転速度を測定したり¹⁶⁾、また、巨大膜パッチで時間解像度を μ s のオーダーにあげて Na-K ポンプの活性化過程を記録する¹⁷⁾ 等である。また、上記2つの担体輸送の他、Na-glucose 共輸送¹⁸⁾、Na-bicarbonate 共輸送による電流¹⁹⁾ など他のトランスポーター電流の報告も相次いでいる。この分野の研究が、さらに

多くの研究者の創意と工夫によって発展することを願うものである。

文 献

- 1) Kimura, J., Noma, A. & Irisawa, H. (1986) Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* **319**, 596-597.
- 2) Kimura, J., Miyamae, S. & Noma, A. (1987) Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J. Physiol.* **384**, 199-222.
- 3) Schnetkamp, P. P. M., Basu, D. K. & Szerencsei, R. T. (1991) The Stoichiometry of Na-Ca + K exchange in rod outer segments isolated from bovine retinas. *Ann. New York Acad. Sci.* **639**, 10-21.
- 4) Fabiato, A., & Fabiato, F. (1979) Calculator programs for computing the composition of the solutions containing multiple metals and ligands used for experiments in skinned muscle cells. *J. Physiol. Paris.* **75**, 463-505.
- 5) Tsien, R. Y., & Rink, T. J. (1980) Neutral carrier ion-selective microelectrodes for measurement of intracellular free calcium. *Biochim. Biophys. Acta.* **599**, 623-638.
- 6) Tsien, R. Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons : design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry.* **19**, 2396-2404.
- 7) Kleyman, T. R., Cragoe, E. J. (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J. Membrane Biol.* **105**, 1-21.
- 8) Li, Z., Nicoll, D. A., Collins, A., Hilgemann, D. W., Filoteo, A., Penniston, J. T., Weiss, J. N., Tomich J. M. & Philipson K. D. (1991) Identification of a peptide inhibitor of the cardiac sarcolemmal Na-Ca exchanger. *J. Biol. Chem.* **266**, 1014-1020.
- 9) Ehara, T., Matsuoka, S. & Noma, A. (1989) Measurement of reversal potential of Na-Ca exchange current in single guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* **410**, 227-249.
- 10) Yasui, K. & Kimura, J. (1990) Is potassium co-transported by the cardiac Na-Ca exchange? *Pflügers Arch.* **415** ; 513-515.
- 11) Collins, A., Somlyo A., & Hilgemann, D.W. (1992) The giant cardiac membrane patch method : stimulation of outward Na-Ca exchange current by MgATP. *J.Physiol.* **454**, 27-57.
- 12) Doering, A. & Lederer W.J. (1993) The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J. Physiol.* **466**, 481-499.
- 13) Gadsby D. C., Kimura, J. & Noma, A. (1985) Voltage dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* **315**, 63-65.
- 14) De Weer, P., Gadsby, D. C. & Rakowski, R. F. (1988) Voltage dependence of the Na-K pump. *Ann Rev. Physiol.* **50** : 225-241.
- 15) Miura, Y. & Kimura, J. (1989) Sodium-Calcium exchange current: Dependence on internal Ca and Na and competitive binding of external Na and Ca. *J.Gen. Physiol.* **93**, 1129-1145.
- 16) Powell, T., Noma, A., Shioya, T. & Kozlowski, R. Z. (1993) Turnover rate of the cardiac Na-Ca exchanger in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* **472**, 45-53.
- 17) Hilgemann, D.W. (1994) The sodium pump at 200kHz. *Biophys. J.* **66**, A236.
- 18) Wright E. M. (1993) The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Ann. Rev. Physiol.* **55**, 575-589.
- 19) Munsch, T., & Deitmer J. W. (1994) Sodium-bicarbonate cotransport current in identified leech glial cells. *J. Physiol.* **474**, 43-53.