

細胞内灌流と giant excised-patch 法

堀 江 稔

(京都大学医学部第三内科)

I. はじめに

全細胞型パッチ・クランプ法は単一細胞を対象とした本法の多くの variation の中でも、スタンダードである¹⁾。この記録法ではピペット電極内と細胞内が物理的に交通しており、ピペット内への細胞内液の流出が起るため観察したい電流が速やかに失活してしまうことが知られている (washout 効果)。たとえば膜7回貫通型受容体と共役する GTP 結合蛋白は、多くのイオン・チャンネルと種々のシグナル伝達系を介して関連していることが知られているが、全細胞型パッチ・クランプ法の研究は長らくの間、ピペット内液に GTP を加えることはなされず、したがって GTP を基質として要求する細胞反応が観察できなかつたり、されてもすぐに失活してしまうような事態が起こっていた²⁾。この問題を避けるため細胞内環境を妨害しないような工夫を加えた variation が本実験技術講座でも紹介される nystatin-perforated patch 法³⁾である。

全細胞型パッチ・クランプのこの欠点は、逆に細胞内液とピペット内液を人為的に交換できるという利点でもあり、本法を用いて細胞内情報伝達に関する多くの研究が行われた。例えば自律神経作動物質による心筋イオン・チャンネルの調節機構などが、詳細に調べられた⁴⁾。しかしながら、経時的に種々の物質を同一細胞内に負荷することは不可能である。これに対し細胞膜の一部をピペット先端に電気的に隔離してくる inside-out 法では細胞内(実際には人工液で灌流される細胞膜内側)の環境を迅速かつ自由に変化させることができる。ところが、この inside-out 法で記録できる電気信号は細胞膜の

微小な一部(数 μm^2)からであり、担体電流や channel density の低い、あるいは、非常に小さなコンダクタンスのチャンネル電流は観察できない。

この2つの variation の短所を補い合い全細胞から電流を記録しつつ細胞内に生体物質を経時的に負荷する方法として開発されたのが、細胞(電極)内灌流である。さらに灌流効率を高め、かつ交換速度を速めるため大きな細胞膜を inside-out 法で単離したのが giant excised-patch 法である。本稿では主に前者について、その具体的な手法を解説する。

II. 歴史的背景

細胞(電極)内灌流法は、パッチ電極を介して電圧(あるいは電流)固定を行っている単一細胞に電極内に入れたインレット・チューブを通じて種々の生体物質やイオンなどを灌流し、個々の細胞におけるチャンネルや担体電流を指標とした情報伝達機構を調べるのに用いられてきた^{5~48)}。理論的にはパッチ・クランプの可能な標本には本法が適用できると考えられるが、今日まで研究に供されることが最も多かった心筋細胞を用いる実験方法を紹介する。本法の開発は、最初、ウサギの単離心房筋細胞において cell-attached 法で単一チャンネルを記録しながら、アセチルコリンを電極内に灌流し、ムスカリン性アセチルコリン受容体と共役するカリウム・チャンネルの開口を観察するために行なわれた⁶⁾。この副島と野間が考案した灌流 device を、次に、松田と野間は、全細胞型パッチ・クランプ(後にこの組み合わせが主流となる)に応用し、細胞内のイオン組成を経時的に変えることにより、モルモット心室筋細胞でカルシウム

電流の単離に成功した⁷⁾続いて Gadsby, 木村, 野間, 入沢らは inside-out 膜では記録困難な Na/K ポンプや Na/Ca 交換機構により運ばれる担体電流の記録に成功した^{8,16)}. さらに亀山, Trautwein, Fischmeister, Hartzell^{10~15)}らによりイオンなどの拡散による交換が容易なもののみならず, cyclic AMP や A-kinase の触媒サブユニットなどの分子量の大きなものも細胞内に負荷されるようになった. また A-kinase ペプチド阻害剤 (Walsh inhibitor)⁴⁹⁾ など元来, 細胞内には存在しない物質も灌流投与することが可能であり, その応用範囲は多岐に亘ることになった.

Ⅲ. 吸引パッチ電極

細胞内灌流のためのパッチ電極には, 肉薄の borosilicate glass capillary (例えば Hilgenberg, Malsfeld, Germany, #1141165, 内径 1.3mm, 外径 1.6mm) を用いる. 印加電圧を一定とする安定化電源を組み込んだ成茂社製 double step puller (RP-83) で 2 段引きして作成する. 後述するようにインレット・チューブを電極内に入れるため, 従来の全細胞型パッチ・クランプ用の電極に比べて先端がより急俊に tapering する形状に作る (図 1 A を参照). したがって第一回目に伸展する glass capillary の幅を若干短くして, 伸展用のおもりを重いものに変更する. われわれは電極抵抗が 1 M Ω 前後のものを作成するが, 当然ながら電極抵抗値が小さく, whole-cell clamp の状態で低い access resistance が得られる程, 細胞内灌流は, 効率よくおこなわれる.

Ⅳ. 電極内灌流用 device (図 1 A)

灌流用 device は, 図 1 A に示すように十字架型をしており, 各々の端部は, a 記録電極部, b 電極支持部とインレット・チューブ, c 排液チューブと排液槽, d 灌流液の reservoir とその流入チューブに接続している. 流入チューブはステンレス・チューブを介して b に示すポリエチレン製のインレット・チューブに繋がって

いる. その先端部の径は図 1 A 中央の拡大図にもあるように約 50 μm で, 外径 2.5mm のポリエチレン・チューブをアルコールランプで細く伸ばしたものを実体顕微鏡下で, 通電した白金線上で加熱することにより二段引きして作成する. a の記録用電極には Ag/AgCl ペレットを用いており短い電線で whole-cell amplifier のヘッド・ステージに接続する. c の排液チューブと排液槽は空気により絶縁されることになり, これによって device にかかわる浮遊容量 (stray capacitance) を大幅に減少することができ, またノイズ源を遮断することができる.

灌流用 device は縦横 12mm の十字架型ポリエチレン製ジョイントとシリコン・チューブを用いて自作するが, このときの重要なポイントは, 各接続部に air leak を起こさないようにすることである. 例えば d のシリコン流入チューブとステンレス・チューブは, ただ単に繋ぐだけでなく, air leak 防止のためにアラルダイト (araldite) 接着剤などで固めることによりシールドを施す. 実験の直前に, この device 全体をタイロッド液で満たす. 同じくタイロッド液を満したパッチ電極を実体顕微鏡下で, この device に装着する. このとき電極内に入るインレット・チューブの開口部が, 図 1 A 中央の拡大図にあるようにピペット先端に可能なかぎり近くなるようにする (200 μm 以内). この距離が長くなると十分な細胞内灌流が得られない. ここまでのポイントをまとめると

[1] パッチ電極の先端が急に細くなるような形状に作ること.

[2] インレット・チューブの先端を可能な限り細くすることである.

[2] は, しかしながら限られた長さのなかで (すなわちパッチ電極の長さ) インレット・チューブを急俊に細くしなければいけないので, 非常に困難である. 我々はより良好な灌流効率を得るためにインレット・チューブの先端を斜に切ることによりより大きな開口部を得る工夫をしている.

V. 灌流液の交換device (流入チューブ・
クランプと灌流液 reservoir 保持器：
図1 B)

このようにして準備した灌流用 device は、充填したタイロッド液が漏れないように排液チューブの部分でクリップ(われわれは血管クレンメを用いている)で止めてからマニピュレーターのステージ上の電極ホルダーに直接、固定する。まず排液チューブと排液槽(c)を繋ぎ、次に記録電極(a)と amplifier のヘッド・ステージを接続する。こうして device の安定を良くした後、灌流液の流入チューブをクランプの細孔(図1 B e)を通してから、タコ糸を図に示したように矢印の方向へ引っ張り(f)、流入チューブの中の灌流液の動きを止めてから、その先端をあらかじめ希望する灌流液を入れた reservoir (g)の中に入れる。第一番目の液は通常、タイロッド液であり、膜接着型のシール作成に成功した後、はじめて二番目以降の reservoir 内の細胞内液と交換する。流入チューブを reservoir に入れるときに小さな気泡が入り込まないように細心の注意を払う。どんなに小さな気泡でもインレット・チューブの先端にトラップされてしまうと、もはや電極内灌流が不可能となる。図1 Bの下に示すように流入チューブ・クランプと灌流液 reservoir 支持器

は、二つで一体のものである。各々成茂製の粗動マニピュレーターに固定しおき、灌流液の交換やシールをあげるために電極内陰圧を加えたときにはクランプで流入チューブを固定してピペット内液が流動しないようにしてから reservoir の方を動かす。

すべての接続を終えたら、air leak がないか導通試験を行う。排液槽の drain 側の一端は通常のシールを作成するために使用する陰圧ポンプに接続してあるので、このバルブを徐々に開放して device の内部に陰圧をかけると最初に流入チューブを入れた reservoir から灌流液が、吸引され排液槽の方に移動し図1 Aのように水滴状に流出してくる。これで交換された溶液の量を知ることができる。吸引圧は10~20 cmH₂O を用い、この条件では数十秒に一滴のリズムで灌流液が落ちる時、経験的に我々の device では一番良好な液の交換が得られる。

突然、排液が停止する原因としては device の中(とくにインレット・チューブの先端)での気泡のトラップがもっとも多い。逆に低い吸引圧でも速やかに灌流液が吸引される場合(例えば数秒に一滴などという早いリズムで灌流液が落ちるとき)は、inlet tube の先端が充分電極の先端に達していないか、灌流液が手前で(インレット・チューブとステンレス・チューブとの接続部が一番多い)leak していることが考えら

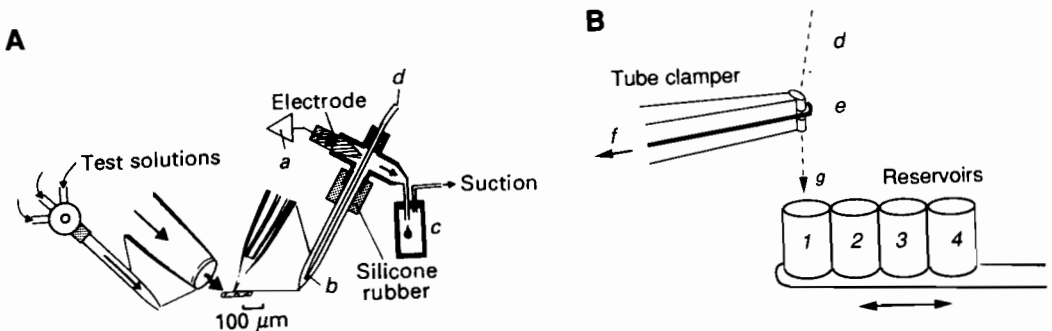


図1 A：細胞内灌流法を用いて実際に実験を行なっているところの模式図。左半分を示す図はガラス電極を利用した rapid superfusion のシステムで、直接は関係ない。各々の電極の先端部分を拡大して図中央に示す。(文献32より改変)

B：流入チューブ・クランプ(左部分)と灌流液 reservoir 保持器(右部分)。詳細については文中の説明を参照のこと。

れる。いずれの場合においても実験は決してうまく行かないので初めから灌流deviceのセットをやり直す。

VI. ギガ・シールの作成

導通試験で問題がなければ、陰圧を一旦解除した後、流入チューブ・クランプを再び固定し device 内の液の動きを停止し、いよいよパッチ電極を記録 chamber に落とす。アクリル板製の chamber は、倒立顕微鏡(Nikon TMD)のステージ上に固定し、容積は 0.5ml 程度で、底はカバー・ガラスにして単離細胞を観察できるようにになっている。あらかじめ36℃に加温したタイロッド液にて灌流する。われわれは細胞内の灌流が可及的速やかに行われることを期待して、比較的小さな単離心筋細胞を選ぶようにしている。パッチ電極を固定したマニピュレータと顕微鏡ステージを操作して細胞の中央にギガ・オーム・シールを作成する。このとき低い水圧の陰圧(10~20 cmH₂O)でシールを完成するほど、細胞に対する障害が少ないためか実験の成功率は高い傾向にある。

シールを完成すれば、一旦、ピペット内への陰圧を解除した後、灌流液の交換 device を操作して(d)の流入チューブ先端を希望する細胞内液の reservoir に移動する。ただし、シールをあげるときには電極内はタイロッド液が充填されているので、このなかの 1.8 mM カルシウムが、次の細胞内液に少量でも混入すると、その Ca 濃度が上昇し、次にパッチ膜を破り全細胞型パッチ・クランプを始めると細胞は収縮して実験はうまく行かないことがある。したがって我々はカルシウム濃度が nM レベルの低い細胞内液の reservoir へタイロッド液を含む流入チューブを移動するときは、予め用意した同じ細胞内液を入れた他の reservoir 内(例えば図1 B2の reservoir)で流入チューブ先端を充分洗ってから移すようにしている。次に、流入チューブ・クランプを弛めて、device 内の液の動きが可能な状態にした後、徐々に陰圧(10~20 cmH₂O)を加え、灌流液の交換を図る。導

通試験のときと同様の要領で灌流の効率や液の交換の程度を知る。各々の device によって異なるが、例えば排液槽で水滴を数えて4滴(これは我々の device の場合)で完全に交換が終わるというような経験値を各自が知ることが大切である。電極内が、タイロッド液から目的とする細胞内液に完全に置き代わったら、流入チューブ・クランプを再び固定し、陰圧が電極先端に直接かかるようにして、パッチ膜を破りパッチ・クランプ実験を始める。ここで灌流実験のポイントを復習しておく。

- [1] 実験の成否は如何によいインレット・チューブを得るかということに尽きる。
- [2] 毎回、安定して良好な状態の device のセットができること。(繰り返し練習して体得する。)
- [3] device を実験槽に入れる前に必ず導通試験をすること。
- [4] ギガ・シールと whole-cell mode の作成は可能な限り低い陰圧で行うこと。
- [5] しばしばインレット・チューブに device 内の微細なゴミが詰まり灌流がとまってしてしまうので、頻回に超音波洗浄をかけること。
- [6] 実験が終わればインレット・チューブや device 全体を大量の蒸留水で洗浄し、ホコリを避けて収納しておくこと。

VII. 細胞内灌流実験の実例(図2)

図2では、この細胞内灌流法を用いてクロライド(Cl)濃度を変化させることにより観察する電流がクロライド感受性であること示す実験の一例を示す。標本は成熟モルモット単離心室筋細胞である。この細胞には1989年の報告^{26,50)}以来、cAMP 依存性プロテインキナーゼによる磷酸化で活性化されるクロライド電流が存在することが知られている。この実験では、アデニレート・サイクレスを直接活性化するフォルスコリン(Fsk)を用いて電流を活性化している。図2 Aの実記録は、保持電位 0 mV での電流で、トレースの下に示すように初め電極内は

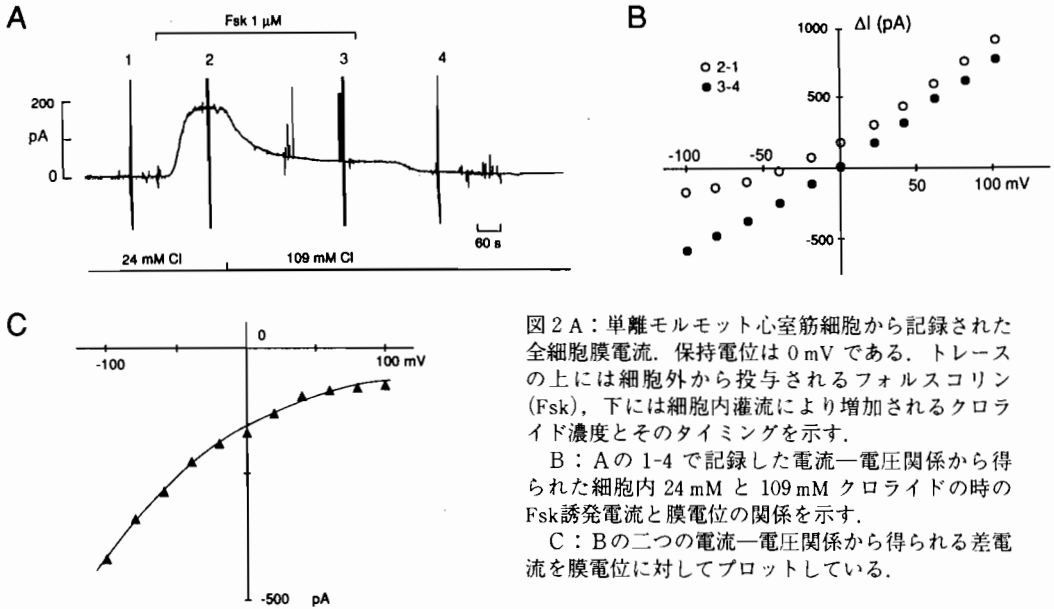


図 2 A: 単離モルモット心室筋細胞から記録された全細胞膜電流。保持電位は 0 mV である。トレースの上には細胞外から投与されるフォルスコリン (Fsk), 下には細胞内灌流により増加されるクロライド濃度とそのタイミングを示す。

B: A の 1-4 で記録した電流-電圧関係から得られた細胞内 24 mM と 109 mM クロライドの時の Fsk 誘発電流と膜電位の関係を示す。

C: B の二つの電流-電圧関係から得られる差電流を膜電位に対してプロットしている。

24 mM のクロライド溶液で充填しておく。Fsk の投与により、0 mV では約 200 pA の外向き電流が誘発されることが分かる。電流の活性化が定常状態に達した後、灌流法を用いて電極内を 109 mM クロライド溶液に置換すると、保持電位では外向き電流は速やかに減少する。その後 Fsk を washout すると電流レベルはさらに減少することが分かる。図 2 B には、A の 1~4 で記録した電流-電圧関係から得られた Fsk 誘発電流を各膜電位に対してプロットしている。中抜き丸 (○) は、電極内が 24 mM クロライドの時、黒丸 (●) は 109 mM クロライドの時の関係を示す。その逆転電位は各々 -40 mV と -2 mV であり、これらの値はクロライドの濃度差から Nernst の式で与えられる平衡電位に近い。したがって、もし細胞内のクロライド濃度が電極内と平衡するとすれば、このとき誘発される電流がクロライド・イオンによって運ばれていることが示唆される。

図 2 C の黒三角 (▲) は、3-2 すなわち電極内クロライド・イオン濃度の増加による電流レベルの変化 (差電流) を示す。濃度変化により、このタイプのクロライド電流のみが影響を受け、かつ実験中に電流の活性レベルが変化しな

いと仮定すると、Goldmann, Hodgkin, Katz の constant field equation からこの時のクロライド・イオンの透過性の指標である P_{Cl} 値と差電流 ΔI の関係は、 $\Delta I = P_{Cl} E_m V F^2 \Delta [Cl]_i / RT \{1 - \exp(E_m F / RT)\}$ で表されることになる⁵¹⁾。 E_m は、膜電位、 $\Delta [Cl]_i$ は、クロライド・イオン濃度差で 85 mM である。F, R, T は、各々ファラデー定数、ガス定数と絶対温度である。この式に実際の実験値を fit させると、細胞膜の容量を $1 \mu F/cm^2$ としてこの細胞は 185 pF であったので、 P_{Cl} 値は $8 \times 10^{-8} cm/s$ と計算される。このように細胞内灌流法を用いて同一細胞内のイオン組成を変えることにより電流の種々の特性を調べることができる。

VII. Giant excised-patch 法について

細胞内灌流法は、いまや電気生理学実験における強力な武器であり、[X] の文献にも紹介するように多くの研究に応用されてきた。しかしながら既述したように、細胞内環境の定量的コントロールや交換速度の速さについては、inside-out 法が優れているので、この利点を生かし、Hilgemann は、細胞に低浸透圧ショックを与え細胞膜の一部を風船状に遊離して、従来

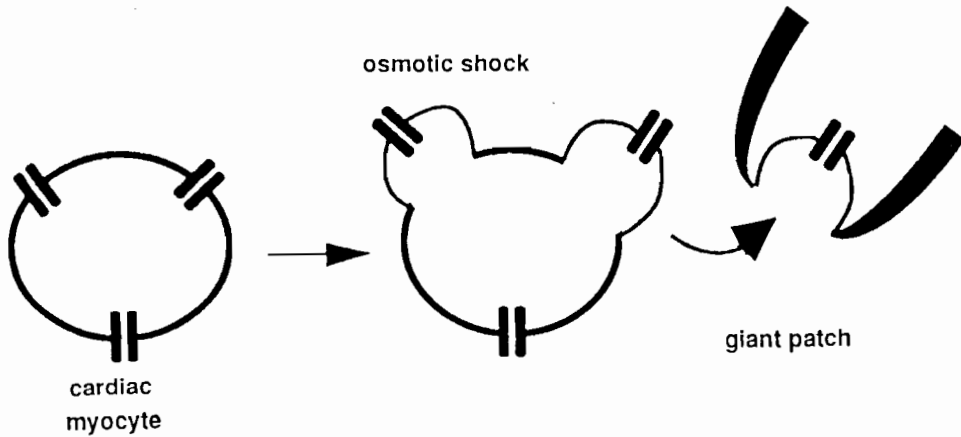


図3：Giant excised patch の作成を模式的に示す。心筋細胞を低浸透圧液に晒すことにより細胞膜が bleb 状に細胞内骨格から遊離する(下図ではミッキーマウスの耳のように変化している)。この膨隆した部分に giant patch 電極を当て、シールが出来れば excision する。

の inside-out の時に比べ数百倍も大きな膜を電氣的に単離して、Na/Ca 交換に伴う担体電流を記録することに成功した⁵²⁻⁶⁶⁾(図3：giant excised-patch法)。

実験に供するピペットの先端径は 12~30 μm もあるが、先端を fire polish して滑らかにしたあと粘度の高い oil で coating することによりギガ・シールを得ることが可能となった。実験では oil の粘度が充分高くないと安定した記録は困難である。その original recipe は、parafilm (薬剤瓶などを密閉するのに常用されるパラフィルム)、acetyltocopherol, heavy mineral oil で、各々を 3:1:1 の割合で混合して加熱しながら 30~60 分、かき混ぜて作成する。これを小指大の量、ガラス板の上に取り、プラスチック棒などでこねながら均一に付着させ引き伸ばすと、非常に薄い膜ができるので、電極先端を 2~3 回通過させることにより coating する。この giant excised-patch 法を用いると、Na/Ca 交換や Na/K ポンプなどの担体電流の他に、チャンネル密度が低いため従来の inside-out 膜では、なかなか捕えることができない、例えば、図2の実験で観察した電流を運ぶ心筋のプロテイン・キナーゼAにより制御されるクロライド・チャンネルも記録することがで

きる⁶⁰⁾。ちなみにこのチャンネルは、分布密度が低いためなのか Ehara と Ishihara の報告⁶⁷⁾では従来の大きさのパッチ電極を用いる cell-attached 法では 20 回に一回程度しか記録できないとされている。

Hilgemann はさらにアフリカ・ツメガエル (Xenopus) の卵細胞膜に、giant excised-patch 法を応用し、Na/Ca 交換を担う蛋白のアミノ酸配列を決定した Philipson との共同研究で、心筋 Na/Ca 交換の蛋白分子を Xenopus 卵細胞に発現させ、その電氣的特性を検討した^{54,55)}。現在、site-directed point mutation や antisense 法などを駆使して、その構造から機能への研究へと進展している。すなわち、本法は遺伝子工学的なアプローチで Xenopus を発現系として用いる場合に好都合である。その時間分解能も良好なこと⁶⁶⁾から、今後、多くの応用が期待される。実験手技などの詳細は Hilgemann 自身の総説があるので参照されたい。

IX. おわりに

パッチ・クランプ実験の多種多様な記録方法の内、細胞内灌流と giant excised-patch について、その手法を中心に紹介した。とくに細胞内灌流は細心の注意を払い多くのステップを成

功して初めて記録の出来る, 非常に繊細な実験である. 本解説が実験成功の一助となれば幸甚である.

X. 文 献

- 1) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391, 85-100.
- 2) Horie, M., Hwang, T-C., Gadsby, D. C. (1992) Pipette GTP is essential for receptor-mediated regulation of Cl^- current in dialyzed myocytes from guinea-pig ventricle. *J Physiol* 455: 235-246.
- 3) Yawo, H., Chuma, N. (1993) An improved method for perforated patch recording using nystatin-fluorescein mixture. *Jpn. J. Physiol* 43 : 267-267.
- 4) Hartzell, H. C. (1988) Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog Biophys Mole Biol* 52 : 165-247.
- 5) 小原正裕・亀山正樹・野間昭典・入沢 宏 (1983) Giga-seal 吸引電極の作成と単一心筋細胞への応用. *日本生理学会誌* 45 : 29-39.
- 6) Soejima, M., Noma, A. (1984) Mode of regulation of the ACh-sensitive K channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflügers Archiv* 400 : 424-431.
- 7) Matsuda, H., Noma, A. (1984) Isolation of calcium current and its sensitivity to monovalent cations in dialysed ventricular cells of guinea-pig. *J. Physiol. (Lond.)* 357 : 553-573.
- 8) Gadsby, D. C., Kimura, J., Noma, A. (1985) Voltage-dependence of Na/K pump current in isolated heart cells. *Nature* 315 : 63-65.
- 9) Sato, R., Noma, A., Kurachi, Y., Irisawa, H. (1985) Effects of intracellular acidification on membrane currents in ventricular cells of the guinea pig. *Cir. Res.* 57 : 553-561.
- 10) Fischmeister, R. and Hartzell, H. C. (1986) Mechanism of action of acetylcholine on calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol* 376, 183-202.
- 11) Kameyama, M., Hofmann, F. and Trautwein, W. (1985) On the mechanisms of β -adrenergic regulation of the Ca channel in the guinea-pig heart. *Pflügers Arch* 405, 285-293.
- 12) Hartzell, H. C., Fischmeister, R. (1986) Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca^{2+} current in single heart cells. *Nature* 323 : 273-275.
- 13) Hescheler, J., Kameyama, M., Trautwein, W. (1986) On the mechanism of muscarinic inhibition of the cardiac Ca current. *Pflügers Arch* 407 : 182-189.
- 14) Kameyama, M., Hescheler, J., Hofmann, F. and Trautwein, W. (1986) Modulation of Ca current during the phosphorylation cycle in guinea pig heart. *Pflügers Arch.* 407, 123-128.
- 15) Kameyama, M., Hescheler, J., Mieskes, G., Trautwein, W. (1986) The protein-specific phosphatase 1 antagonizes the beta-adrenergic increase of the cardiac Ca current. *Pflügers Arch* 407 : 461-463.
- 16) Kimura, J., Noma, A., Irisawa, H. (1986) Na-Ca exchange current in mammalian heart cells. *Nature* 319 : 596-597.
- 17) Nakao, M., Gadsby, D. C. (1986) Voltage dependence of Na translocation by the Na/K pump. *Nature* 323 : 628-630.
- 18) Fischmeister, R. and Hartzell, H. C. (1987) Cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate regulates the calcium current in single cells from frog ventricle. *J. Physiol., Lond.* 387, 453-472.
- 19) Hartzell, H. C., Fischmeister, R. (1987) Effect of forskolin and acetylcholine on calcium current in single isolated cardiac myocytes. *Mole. Pharmacol.* 32 : 639-645.
- 20) Hescheler, J., Kameyama, M., Trautwein, W., Mieskes, G. and Soling, H-D. (1987) Regulation of the cardiac calcium channel by protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.* 165, 261-266.
- 21) Argibay, J. A., Fischmeister, R., Hartzell, H. C. (1988) Inactivation, reactivation and pacing dependence of calcium current in frog cardiocytes: correlation with current density. *J. Physiol.* 401 : 201-226.
- 22) Gilbert, M. P., Fischmeister, R. (1988) Atrial natriuretic factor regulates the calcium current in frog isolated cardiac cells. *Circ. Res.* 62 : 660-667.
- 23) Hescheler, J., Trautwein, W. (1988) Modification of L-type calcium current by intracellularly applied trypsin in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol* 404 : 259-274.
- 24) Tseng, G. N. (1988) Calcium current restitution in mammalian ventricular myocytes is modulated by intracellular calcium. *Circ Res* 63 : 464-482.
- 25) White, R. E., Hartzell, H. C. (1988) Effects of intracellular free magnesium on calcium current in isolated cardiac myocytes. *Science* 239 : 779-780.
- 26) Bahinski, A., Nairn, A. C., Greengard, P. and Gadsby, D. C. (1989) Chloride conductance regulated by cyclic AMP-dependent protein kinase in cardiac myocytes. *Nature* 340 : 718-721.
- 27) Duchatelle-Gourdon, I., Hartzell, H. C., Lagrutta, A. A. (1989) Modulation of the delayed rectifier potassium current in frog cardiomyocytes by beta-adrenergic agonists and magnesium. *J. Physiol* 415 : 251-274.
- 28) Fischmeister, R. and Shrier, A. (1989) Interactive effects of isoprenaline, forskolin, and acetylcholine on Ca^{2+} current in frog ventricular

- myocytes. *J. Physiol.* 417 : 231-239.
- 29) 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.
 - 30) Hagiwara, N. and Irisawa, H. (1989) Modulation by intracellular Ca^{2+} of the hyperpolarization-activated inward current in rabbit single sino-atrial node cells. *J. Physiol.* 409, 121-141.
 - 31) Hartzell, H. C., White, R. E. (1989) Effects of magnesium on inactivation of the voltage-gated calcium current in cardiac myocytes. *J. Gen. Physiol.* 94 : 745-767.
 - 32) Horie, M. and Irisawa, H. (1989) Dual effects of intracellular magnesium on muscarinic potassium channel current in single guinea-pig atrial cells. *J. Physiol.* 408, 313-332.
 - 33) Levi, R. C., Alloatti, G., Fischmeister, R. (1989) Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch.* 413 : 685-687.
 - 34) Matsuoka, S., Ehara, T. and Noma, A. (1990) Chloride-sensitive nature of the adrenaline-induced current in guinea-pig cardiac myocytes. *J. Physiol.* 425 : 579-598.
 - 35) Nakao, M., Gadsby, D. C. (1989) [Na] and [K] dependence of Na/K pump current-voltage relationships in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 94 : 539-565.
 - 36) Ono, K., Trautwein, W. (1991) Potentiation by cyclic GMP of beta-adrenergic effect on Ca^{2+} current in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol* 443 : 387-404.
 - 37) Parson, T. D., Lagrutta, A., White, R. E. and Hartzell, H. C. (1991) Regulation of Ca^{2+} current in frog ventricular cardiomyocytes by 5'-guanylyl-imidodiphosphate and acetylcholine. *J. Physiol.* 432 : 593-620.
 - 38) Duchatelle-Gourdon, I., Lagrutta, A. A., Hartzell, H. C. (1991) Effects of Mg^{2+} on beta-adrenergic stimulated delayed rectifier potassium current in frog atrial myocytes. *J. Physiol.* 435 : 333-347.
 - 39) Tareen, F. M., Ono, K., Noma, A. and Ehara, T. (1991) β -Adrenergic and muscarinic regulation of the chloride current in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* 440 : 225-241.
 - 40) Tseng, G. N. (1991) Different effects of intracellular Ca and protein kinase C on cardiac T and L Ca currents. *Am. J. Physiol.* 261 : H 364-379.
 - 41) Hartzell, H. C., Budnitz D (1992) Differences in effects of forskolin and an analog on calcium currents in cardiac myocytes suggest intra- and extracellular sites of action. *Mol. Pharmacol.* 41 : 880-885.
 - 42) Hwang, T-C., Horie, M., Nairn, A. C., Gadsby, D. C. (1992) Roles of GTP-binding proteins in the regulation of cardiac chloride conductance. *J. Gen. Physiol.* 99 : 465-489.
 - 43) Ono, K., Tareen, F. M., Yoshida, A. and Noma, A. (1992) Synergistic action of cyclic GMP on catecholamine-induced chloride current in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol.* 453 : 647-661.
 - 44) Tseng, G. N. (1992) Cell swelling increases membrane conductance of cardiac cells: evidence for a volume-sensitive Cl channel. *Am. J. Physiol.* 262 : C 1056-1068.
 - 45) Frace, A., Hartzell, H. C. (1993) Opposite effects of phosphatase inhibitors on L-type calcium and delayed rectifier currents in frog cardiac myocytes. *J. Physiol.* 472 : 305-326.
 - 46) Hanf, R., Li, Y., Szabo, G., Fischmeister, R. (1993) Agonist-independent effects of muscarinic antagonists on Ca^{2+} and K^{+} currents in frog and rat cardiac cells. *J. Physiol.* 461 : 743-765.
 - 47) Hwang, T-C., Horie, M., Gadsby (1993) Functionally distinct phospho-forms underlie incremental activation of protein kinase-regulated Cl^{-} conductance in mammalian heart. *J. Gen. Physiol.* 101 : 629-650.
 - 48) Parsons, T. D., Hartzell, H. C. (1993) Regulation of Ca^{2+} current in frog ventricular cardiomyocytes by guanosine 5'-triphosphate analogues and isoproterenol. *J. Gen. Physiol.* 102 : 525-549.
 - 49) Cheng, H. C., B. E. Kemp, R. B. Pearson, A. J. Smith, L. Miconi, S. M. Van Patten and D. A. Walsh (1986) A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 261 : 989-992.
 - 50) Harvey, R. D. and Hume, J. R. (1989) Autonomic regulation of a chloride current in heart. *Science* 244, 983-985.
 - 51) Hille, B. (1984) "Ionic channels of excitable membranes." Sinauer Associates Inc., Sunderland, MS, 226-248.
 - 52) Hilgemann, D. W. (1989) Giant excised cardiac sarcolemmal membrane patches: sodium and sodium-calcium exchange currents. *Pflügers Arch* 415 : 247-249.
 - 53) Hilgemann, D. W. (1990) Regulation and deregulation of cardiac Na-Ca exchange in giant excised sarcolemmal membrane patches. *Nature* 344 : 242-245.
 - 54) Hilgemann, D. A., Nicoll D. A., Philipson, K. D. (1991) Charge movement during Na translocation by native and cloned cardiac Na/Ca exchanger. *Nature* 352 : 716-718.
 - 55) Li, Z., Nicoll, D. A., Collins, A., Hilgemann, D. W., Filoteo, A. G., 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.
 - 56) Hilgemann, D. W., Collins, A. (1992) Mechanism

- of cardiac Na-Ca exchange current stimulation by MgATP: possible involvement of aminophospholipide translocase. *J. Physiol.* 454 : 59-82.
- 57) Hilgemann, D. W., Matsuoka, S., Nagel, G. A., Collins, A. (1992) Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Sodium-dependent inactivation. *J. Gen. Physiol.* 100 : 905-932.
- 58) Hilgemann, D. W., Collins, A., Matsuoka, S. (1992) Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Secondary modulation by cytoplasmic calcium and ATP. *J. Gen. Physiol.* 100 : 933-961.
- 59) Matsuoka, S., Hilgemann, D. W. (1992) Steady-state and dynamic properties of cardiac sodium-calcium exchange. Ion and voltage dependencies of the transport cycle. *J. Gen. Physiol.* 100 : 963-1001.
- 60) Nagel, G. A., Hwang, T. C., Nastiuk, K. L., Nairn, A. C., Gadsby, D. C. (1992) The protein kinase A-regulated cardiac Cl-channel resembles the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 360 : 81-84.
- 61) Collins, A., Somlyo, A. V., Hilgemann, D. W. (1992) The giant cardiac membrane patch method: stimulation of outward Na-Ca exchange current by MgATP. *J. Physiol.* 454: 27-57.
- 62) Matsuoka, S., Nicoll, D. A., Reilly, R. F., Hilgemann, D. W., Philipson, K. D. (1993) Initial localization of regulatory regions of the cardiac sarcolemmal Na-Ca exchanger. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 : 3870-3874.
- 63) Collins, A., Hilgemann, D. W. (1993) A novel method for direct application of phospholipids to giant excised membrane patches in the study of sodium-calcium exchange and sodium channel currents. *Pflügers Arch.* 423: 347-355.
- 64) Doering, A. E., 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.
- 65) Hilgemann, D. W. (1994) Channel-like function of the Na, K pump probed at microsecond resolution in giant membrane patches. *Science* 263 : 1429-1432.
- 66) Matsuoka, S., Hilgemann, D. W. (1994) Inactivation of outward Na-Ca exchange current in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.* 476. 3 : 443-458.
- 67) Ehara, T., Ishihara, K. (1990) Anion channels activated by adrenaline in cardiac myocytes. *Nature* 347 : 284-286.