

単一チャネルデータ解析法

曾我部 正 博

(名古屋大学医学部第二生理学教室)

はじめに

— 単一チャネル電流とはなにか —

機能中の1分子の動きを捕らえることは、科学計測における究極の技術である。一部の例外を除けば、多くの計測は分子集団に対して行われる。しかるのちに、統計力学の助けを借りて1分子の挙動を推定することになる。そうしてみると、間接的にはあれ、イオンチャネル1分子の挙動を実時間で観測できる技術は大したものである。ここで間接的というのは、我々が観ているものがチャネル1分子の構造変化ではなくて、その結果生じた電流変化であるという意味である。イオンチャネルの並はずれて高い酵素活性によって、チャネル1分子の活性化(開)が、莫大な数のイオンの流れ(電流)に変換されるが故に、我々の目に観測可能となる。例えば、100 mVの膜電位下で10 pSのコンダクタンスをもつチャネルが開いたときに流れる電流は1 pA (10^{-12} A)となる。電気素量(1.6×10^{-19} クーロン)でイオンの数に変換すれば、 6.25×10^6 、すなわち毎秒約6百万個のイオンの実効的な移動があることになる。チャネルはそもそも超高ゲインの電流生成変換器なのである。この値から単純にイオンの実効移動速度を割り出すと、約160 nsec/channelとなる。つまり平均160ナノ秒に一個の割合でイオンが移動する。もし超高速の電荷カウンターがあれば、チャネルを通過する電流を個々のイオン移動の離散的時系列として観測できるはずであり、イオン透過機構に関するより詳細な情報を得ることができよう。しかし実際には、電流増幅器の応答速度の制限のために、せいぜい100 μ sec中に移動した電荷の積分量を電流として

見ているに過ぎない。また同様の理由で、チャネル開閉の途中経過や高速の開閉そのものも充分には時間分解できない。そしてなにより、種々の背景雑音のために、微小で速い電流変化についてはお手上げの状態である。こうして、究極の技術といえども諸々の限界があるのだが、今までに知られている主要なチャネルは、幸いこれらの限界内ではほぼ生理応答(細胞応答)との関連がついている。これから解説するデータ処理については、こうした限界を頭の隅に留めつつ、通常の実験室で実現可能な手法を中心に述べていきたい。

1. 実験手技 — ドリフト対策 —

単一チャネル電流の計測法には、脂質平面膜法とパッチクランプ法の2通りがあるが、詳しいことは他の文献^{1,2)}を参照いただくことにして、ここではパッチクランプ法について簡単に解説する。最も基本的なモードはcell-attached mode (on-cell mode)で、次いで、excised mode (inside-out, outside-out)があり、最近 open cell-attached inside-out, perforated vesicle outside-out という新しい方法も開発された。それぞれの手技および利点、欠点は本シリーズの論文³⁾を参照していただきたい。いずれにしても、微小な単一チャネル電流を計測するので、1) 背景雑音の減弱と、2) 容量補正の2点が重要である。また whole-cell 記録に比べて格段に長い記録が要求されるので、3) ドリフトに対する対策も重要である。1) と 2) についてはやはり前出の論文³⁾に詳しいので、ここでは 3) についてのみに注意点をのべる。ただしアンプや電気系統のドリフトは問題外である。cell attached mode の際に深刻なのが、マ

ニピュレータのドリフトである。これによってシール抵抗が変化してリーク電流やノイズのレベルが変動することがある。ドリフトの原因としては、顕微鏡ステージとマニピュレータの機械的ズレがあり、これはマニピュレータを、ステージあるいは顕微鏡本体にしっかり取付け、可能な限りヘッドステージの固定点から電極先端までの距離を短くすることで解決する。問題は油圧あるいは水圧マニピュレータを用いたときの、熱膨張に起因するドリフトである。当然熱膨張係数の小さい水圧式が優れており、発売当初は問題があったものの、現在のバージョン(成茂科学器械, Newport)は実用的な性能に向上しているようである。より安定なのは機械式であろう。ただし手動式の場合、手を触れたときに大きなドリフトが生じてしまう欠点がある。そこでステッピングモータ(成茂科学器械)、サーボモータ(Newport, Eppendorf)あるいは piezo 駆動(Sutter, Burleigh)のリモート制御方式が優れているが、高価なのが欠点である。予算が許せばこれをお勧めしたい。つぎに問題になるのが小容量のチャンバーを使った時に起こる溶液の蒸発である。一回の記録では問題にならないが、実験を繰り返すうちに溶液濃度が

変化し、水面レベルの変化で補正容量にズレが生じる。適当に蒸留水を追加するのは適切な方法ではない。実験にもよるが、灌流するか、シリコンオイルを微量添加して水面上に油膜を作ることによって対処することができる。

2. データの記録と信号前処理

1) データの記録

一般的な測定のダイアグラムを図1に示す。whole cell 記録の場合にはデータはオンラインで刺激信号と同時に直接コンピュータのハードディスクに取り込むが、単一チャンネル電流の測定ではデータ量が多いので、データレコーダに記録した後、オフラインで本格的なデータ解析を行うのが一般的である。例えば、チャンネル開閉のキネティクスを解析する場合、一般に1000事象以上が要求されるが、平均1ミリ秒の開事象が平均1秒に1回生起するとすれば、10 KHz のサンプリングで1000秒間記録する必要がある。12ビットの A/D コンバータを使用すれば、1サンプル当り2バイト必要なので、合計 $2 \times 1000 \times 10000 = 2 \times 10^7 = 20 \text{ MB}$ のメモリを消費することになる。ここまで極端ではないにしろ、1実験あたり数 MB が必要とされる

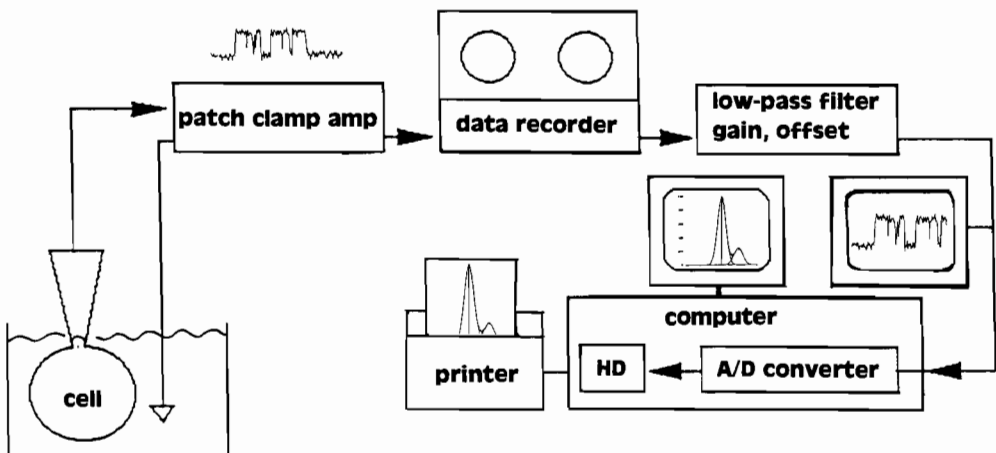


図1. 単一チャンネル電流の計測・解析のための一般的装置：パッチクランプアンプからの未処理出力はデータレコーダに入力されると同時に、レコーダのモニター出力からフィルタとA/Dコンバータを介してコンピュータのハードディスクに記録される。オフラインで解析するときは、同じ構成で記録テープを再生すればよい。

ので、すべてをハードディスクに蓄えておくことは現実的ではない。しかしデータをすぐ解析するには同時にハードディスクにも記録しておく必要がある。そのために記録はデータレコーダとハードディスクの並列記録となる。前者はできるだけ高い周波数で記録し、後者は波形モニターを兼ねるので適当なフィルタをかけて記録して、予備解析が終わればディスクから消去するのが普通である。データレコーダへの記録に際して、できるだけ入力ダイナミックレンジ(通常 $\pm 10\text{V}$)を有効に利用するように増幅器のゲインを調整しておく必要がある。

データレコーダとしては、FM、PCM、DATレコーダが使われるが、コストパフォーマンスの良いPCMタイプ(例えばInstrutech VRシリーズ)が最も良く使われているようである。この機種では周波数特性も44kHzあり実用上問題は無い。多少面倒なのが、再生時にデータレコーダから目的の場所をサーチする手間である。しばしばコンピュータへの再取り込みが必要だからである。PCMレコーダでは、家庭用VTRを記録器として使うので、一般的にはタイムカウンタを目安にして再生場所を探すことになる。再生位置の正確を期したい場合にはテープ上にタイムコードを記録してサーチするのが最も良いが、これをサポートしている解析ソフトウェアは市販されていない。次善の策として、VTRかPCM変換器のインデックスマーカーを使うか、補助チャンネルにトリガ信号を記録してこれを目安にコンピュータへの取り込みを開始することはできる。また適当に取り込みをしたあと、ソフトウェア的に再生したデータから必要な部分のみを選んで解析することもできる。

2) 信号の前処理

ー ゲイン調整とフィルタ設定 ー

データレコーダの再生信号を、A/Dコンバータを介してコンピュータに取り込む場合いくつか注意すべきことがある。すでにデータレコーダの項でも述べたが、出力電圧のレンジをできるだけ、A/Dコンバータの入力レンジ(通常

$\pm 5\sim 10\text{V}$)に合わせることである。一度A/D変換したものは、あとでいくら増幅しても精度は回復しない。もしテープ上に記録されたデータの電圧レンジがA/Dコンバータの入力レンジとマッチしていないときは、間にブースターアンプを挿入するか、プログラマブルA/Dコンバータの入力レンジをソフトウェア上で調節しておく。場合によってはオフセット電圧の調整が必要なこともある。

しかし最も重要なのはローパスフィルタの設定である。これは2つの目的で使用される。まず、信号成分に含まれる高周波の雑音成分を取り除くためである。このときフィルタに要求される性能は、忠実な波形再現と急峻な遮断特性であるが、生体信号では前者が優先される。その意味で位相遅れ(これがあると波形が歪む)が少ない遅延平坦特性を有するベッセル(Bessel)フィルタが最適である。このフィルタの欠点は遮断特性が緩やかな点であるが、4~8次(-24~-48dB/oct)のものであれば使える。後(5-1-b)に述べるように、フィルタの遮断周波数(信号が-3dB減衰する周波数)の決定は、信号の忠実な再現と雑音除去の妥協の中で判断すべき難しい問題である。ソフトウェアの中にはデジタル・ガウシアン(Gaussian)フィルタを備えたものもある。処理速度さえ問題なければ、高い周波数で取り込んだデータを何回でも処理できるので大変便利である。ガウシアンフィルタの特性は高次のベッセルフィルタとほぼ同様である。

フィルタを使う第2の理由は、A/Dコンバータのサンプリングによって生じるエイリアジングを防ぐためである。信号成分の中にサンプリング周波数より高い周波数成分が含まれていると偽信号が発生する(エイリアジング)からである。標本化定理によれば、取り込みたい最高周波数の2倍のサンプリング周波数があれば元の信号を忠実に再現できる。逆に言えばサンプリング周波数はフィルタの遮断周波数の2倍という関係になっていればよい。しかし実際には遮断周波数で信号が完全に遮断されるわけではな

いので、フィルタを通過した信号を忠実に再現し、かつエリアジングを防ぐには、少なくとも遮断周波数の5~10倍のサンプリング周波数が必要になる。A/Dコンバータの最高サンプリング周波数は製品によって違うので、この点も良く考慮して最終的な遮断周波数を決定しなければならない。ゲイン、オフセット調整つきのベッセルフィルタが販売されているので(Warner, Frequency Device), これを使えば、本稿で述べた信号前処理を一台の装置ですませることができて便利である。

3. コンピュータ, 解析ソフトウェア, A/Dコンバータ

コンピュータは使うべき解析ソフトウェアによって決定する。なんといってもIBM PC/AT互換機(いわゆるDOS/Vマシン)上で走るソフトウェア(pCLAMP(Axon), PAT(Dagan), ISO₂(MKF)など)が圧倒的に多い。以前のPC/AT互換機はソフトウェアやA/Dコンバータとの相性(ISAバスのタイミングのズレなど)でトラブルが多かったが、最近では名の通ったマザーボードを使用したものであれば、大丈夫のようである。近頃MAC上で動くソフトウェアTAC(Heka)もリリースされたが、多少未熟な感じである。NEC 98 ユーザには日本光電からも解析ソフトウェア(QP-120J)が発売されている。コプロセッサは必須と考えたほうがよく、その意味で486DXマシンが適当であろう。もしデータの2次加工を同一のマシン上で行うとすれば、Windowsが快適に動く8MB・RAM, 300MB超のHDは用意したいところである。A/Dコンバータは、当然ソフトウェアがサポートしているものを使うことになる。pCLAMPであればDigidata(Axon), もしくはLabmaster DMA(Scientific Solution), PATであればLabmaster DMA, DT 2801 A(Data Translation), LabPC+(National Instruments)などが代表的であり、価格は20~50万程度である。価格差は主に最高サンプリング周波数の違いを反映しているので、目的にあったものを選択する必要がある。

すでに指摘したように観測したい周波数(遮断周波数)の最低5倍のサンプリング周波数を目安にするとよい。一般にA/Dコンバータは、付属のD/Aコンバータから刺激を発生しながら、入力波形をモニタし、同時にハードディスクに信号を書き込むので、高速データ転送のできるDMA(direct memory access)が可能なものが望ましい。

筆者はpCLAMPとPATを使用しているが、これから示す解析例は主として後者によるものである。

4. 振幅解析

単一チャンネル電流の解析は一般に2段階からなる。すなわち振幅解析と開閉キネティクス(ゲーティング)の解析である。まず振幅のall point histogram解析が出発点になる。横軸に電流値、縦軸に頻度をプロットしたものから3つの情報が得られる。一つは言うまでもなくチャンネルコンダクタンスで、もうひとつはチャンネルの開確率であり、最後にパッチ膜中のチャンネル数の下限である。

1) コンダクタンスの推定

簡単にコンダクタンスを知りたいときは、ベースラインのピーク値を零点として、開電流のピーク値をカーソルで読めばよい。より定量的に解析したいときは、ガウス分布曲線でピーク値を推定する。通常複数個のピークを同時にガウス近似できるが、うまくいかないときは、明瞭なピークから順番に近似していけばよい。この方法は雑音レベルが高くてピークの視認が難しい時に威力を発揮する(図2a, b)。問題なのは、高速の開閉があるときに、測定系の周波数限界のために、完全に閉じない、あるいは開ききらないようにみえる事象が多く混入する場合である。このとき、ピークの分布型は左右に非対称な歪み(skew)を含むものになり、ガウス曲線ではピークの推定値は真の値からずれてしまう(図3a)。この場合には、未分解の事象を含まない右肩のデータだけで近似を行うとよい(図3b, c)。しかしノイズレベルが大きく

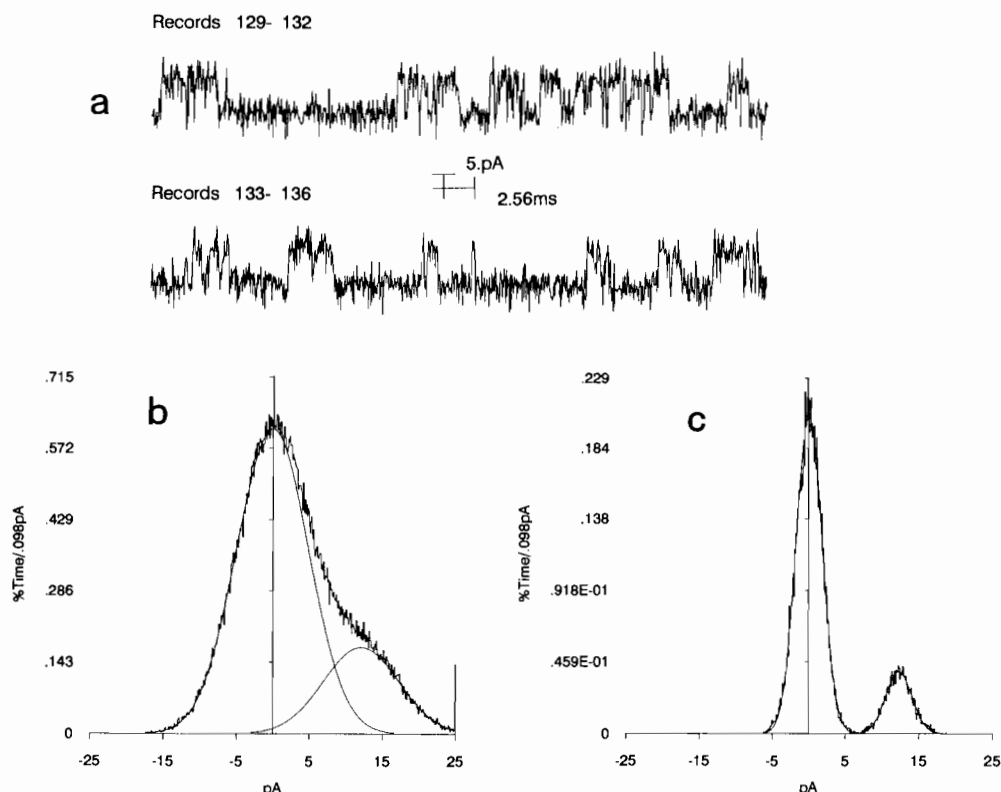


図2. 単一チャンネル電流の推定法. a. 単一チャンネル電流の一例(平均値, 12, 49 pA). b. 振幅ヒストグラムとガウス分布(滑らかな曲線)によるフィッティング(推定ピーク値=12.09 pA). c. Patlakの移動平均(8ポイント)処理後の振幅ヒストグラム(推定ピーク値=12.3 pA). この処理によって, ピークは明瞭に分離しているが, ピーク下の面積比は真の値から大きく外れることに注意.

て, 開閉のピークが大きく重なる場合は, ガウス近似でも正確にピーク値を推定することが難しい場合がある. そんなときには, なんらかの方法でノイズを軽減する必要がある. 最も単純なのは, 低域フィルタで高周波ノイズを除去する方法であるが, 情報を失うことになるので, あとあとのゲーティングの解析を考えると望ましくない(ただし, ソフトウェア上でデジタルフィルターを施す場合はこの限りではない). 最も有効なのは, Patlakの移動平均である⁴⁾. 適当な幅の窓(データポイント数)を設定して移動平均すると, 単なる all point histogram より明瞭なピークを持つヒストグラムが得られる(図2 c). このとき開閉の遷移点を含む移動平均値が純粋な開または閉のみの平均値に対して

大きな偏差を持つことを利用すれば, こうした特異な移動平均値はプログラム上で自動的に取り除くことができる. それでもピーク分離が困難な場合は, 元のトレースを表示して, カーソルで確実な開あるいは閉の範囲を指定してその区間の平均値を求め, これを何度か繰り返して開閉の平均値を求めるしかない.

振幅解析から得られるチャンネルコンダクタンスはもっぱらチャンネルのイオン透過機構の解析に用いられる. 例えば a) 電位依存性, b) 透過イオン濃度依存性, c) ブロッカー濃度依存性, あるいは d) ブロッキングの電位依存性などが得られる. これらの関係からイオン透過機構を解析する際の理論は Eyring の絶対反応速度論が用いられる. 即ち, チャンネルを透過

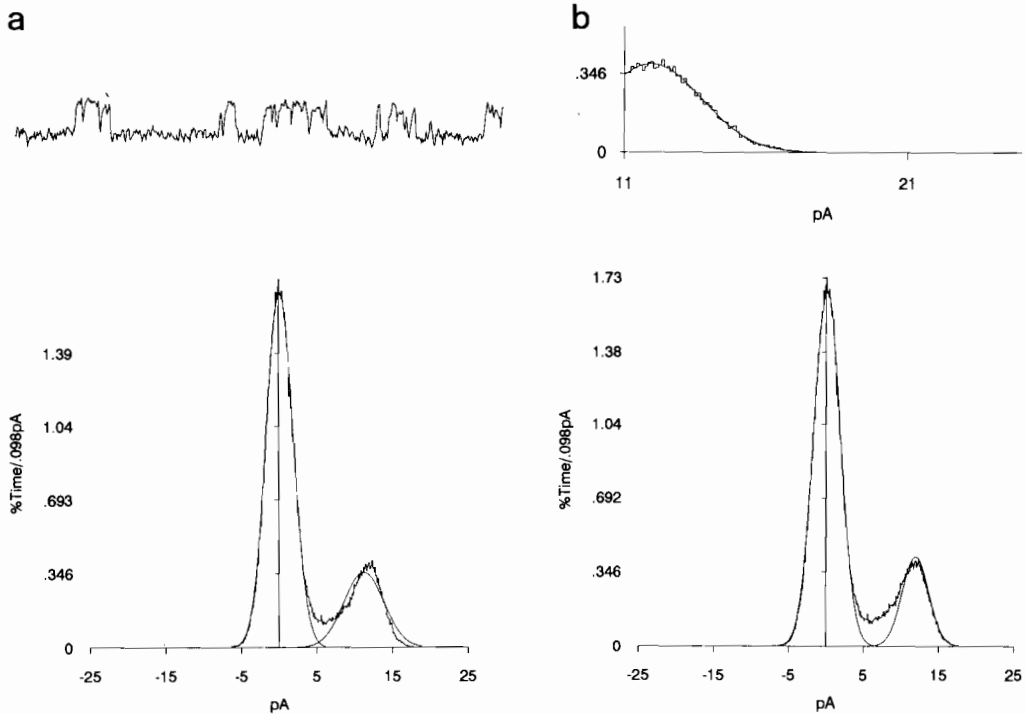


図3. 振幅ヒストグラムのピークが正規(ガウス)分布でない場合のフィッティング. a, フィルタの遮断周波数(f_c)が低すぎて、高速の開閉が十分に時間分解できていない記録例(上)とその振幅ヒストグラム(下). ガウス分布による推定値が真値より大きくずれている. b, 処理領域を第2ピークの右肩に限定してフィッティングしたのち(上), この推定値を固定して全体を再度フィッティングした例(下).

イオンやブロッカーに対するいくつかのエネルギー障壁で表現し、その山と谷の数や相対的位置とエネルギー値を上記の関係から推定するのである。詳しくは文献を参照されたい⁵⁾。最近では、イオン透過部位のアミノ酸配列も明らかになりつつあるので、分子動力学を用いてイオン透過のプロセスをシミュレーションすることも可能になりつつある。

2) 開確率とチャネル数の推定

チャネルの開確率(P_o)は、パッチに一個のチャネルのみが含まれている場合には、ガウス分布で近似した各ピーク下の面積の比率から容易に求めることができる。あるいはゲーティングの解析をしたときに、ソフトウェアが開時間と閉時間の総計を報告してくるのでそれを用いてもよい。複数個のチャネルが含まれる場合は、開確率が小さくかつチャネルの総数 N が分かっ

ている場合にのみ $P_o = 1 - P_c^{1/N}$ で求められる。ここで P_c は総記録時間のうち閉状態が占める割合である。なぜならば、 P_c はすべてのチャネルが同時に閉じている確率なので、一個のチャネルの開確率を P_{ci} とすれば $P_c = P_{ci}^N = (1 - P_o)^N$ が成り立つからである。チャネル総数 N は、開確率が大きい場合には、同時に開口するチャネルの最大数と一致する。開確率が低くて同時開口事象が観察されないか極めて稀である場合には、ゲーティングの解析から平均開閉時間を推定して、何個のチャネルであるかを統計的に検定しなければならない。このとき平均開時間は直接求められるが、真の平均閉時間は、チャネルが N 個の場合、見かけのそれの約 N 倍になると仮定できる。そうするとチャネルが N 個の場合の同時開口確率の期待値が計算でき、 N 個のチャネルが含まれるという仮説が検

定可能となる。勿論低い同時開口確率にみあう多数の事象数が必要である。例えば、開確率が0.01であれば2個のチャンネルの同時開口確率は0.0001となり、少なくとも数千事象のデータがなければ信頼できる検定はできない⁶⁾。逆に一旦、特定のチャンネルのその条件下での平均開閉時間が分かれば、観測されるみかけの平均閉時間からチャンネル数を推定することができる。あるいは、チャンネルの同時開口頻度が2項分布に従うことを利用して推定することも可能である⁷⁾。

5. ゲーティングの解析

振幅解析はチャンネルの定常的性質に関するものであるが、イオンチャンネルの性質を決めるもう一つの重要なパラメータは各開閉状態間の遷移速度定数である。これらはチャンネルの開確率を通してマクロな定常応答の大きさを決めるだけではなく、刺激変化に対するマクロな応答速度を支配する。速度定数は単一チャンネル電流の開閉の持続時間(dwel time)の解析によって推定することができる。持続時間の解析は、1) 開閉遷移の検出と、2) 持続時間ヒストグラムの作成と解析、および、3) 反応モデルの決定の3つのステップからなる。

1) 開閉遷移の検出

a) いき値レベルの設定

コンピュータ解析が普及する前は、チャートレコーダーのデータを人力で解析していたが、極めて時間がかかり不正確になる。しかし余程理想的な記録でないかぎり、自動化することも容易ではない。それは背景ノイズの混入、高速の opening, バーストでみられる高速の closing, サブステートの存在、複数チャンネルの同時 opening などによって訓練された研究者ですら状態の区別が困難な記録がままあるからである。ここではまず簡単な場合から順を追って説明する。

最も一般的な手法は、適当ないき値レベルを設定して遷移を判別する方法であり、通常は振幅解析で求めた単一チャンネルコンダクタンスの

50%にいき値を設定する。これ以外のレベルに設定すると持続時間の推定に誤差が生じる。その理由は、開電流の波形が測定系の低域フィルタ効果のために、完全な方形波ではなく、台形状に変形しているからである。50%以上では開時間が過小評価となり、50%以下では過大評価となる。閉時間についてはこれと逆になる。

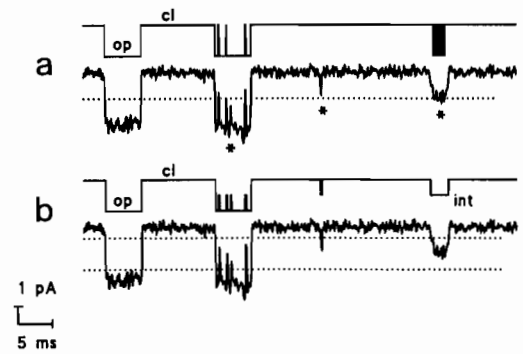


図4. 2レベルいき値法による遷移検出の改善例. a, 一般的な1レベルいき値法(50%)による検出. 上段は検出後の理想化されたトレースを示す. *印の部分が未分解, サブステート, 雑音による誤検出箇所を示す. b, 2レベルいき値法(25%と75%)による検出例. aでの誤検出箇所はサブステートレベルに分離されている. 文献(9)より.

しかしこの方法では、しばしば見られるサブステートや高速の開閉を適切に検出することは困難で、大きな誤差を生じることがある(図4 a). これを軽減する有効な方法として、2レベルいき値法がある⁸⁾. 例えば閉レベルから25%と75%の2レベルにいき値を設定し、開, 中間状態, 閉の3状態に分類するわけである(図4 b). 個々の持続時間の推定の正確さを多少犠牲にしてもはるかにメリットのある場合がある。

b) 背景ノイズの軽減

実際に遷移検出で最も問題になるのは、高周波の背景ノイズである。具体的な例を見てみよう。図5 a はノイズ無しの理想的開閉をコンピュータで発生したものである。単一電流は12.5 pA, 開閉平均時間はそれぞれ1.03 ms, と1.65 ms に設定してある。これに2.5 pA

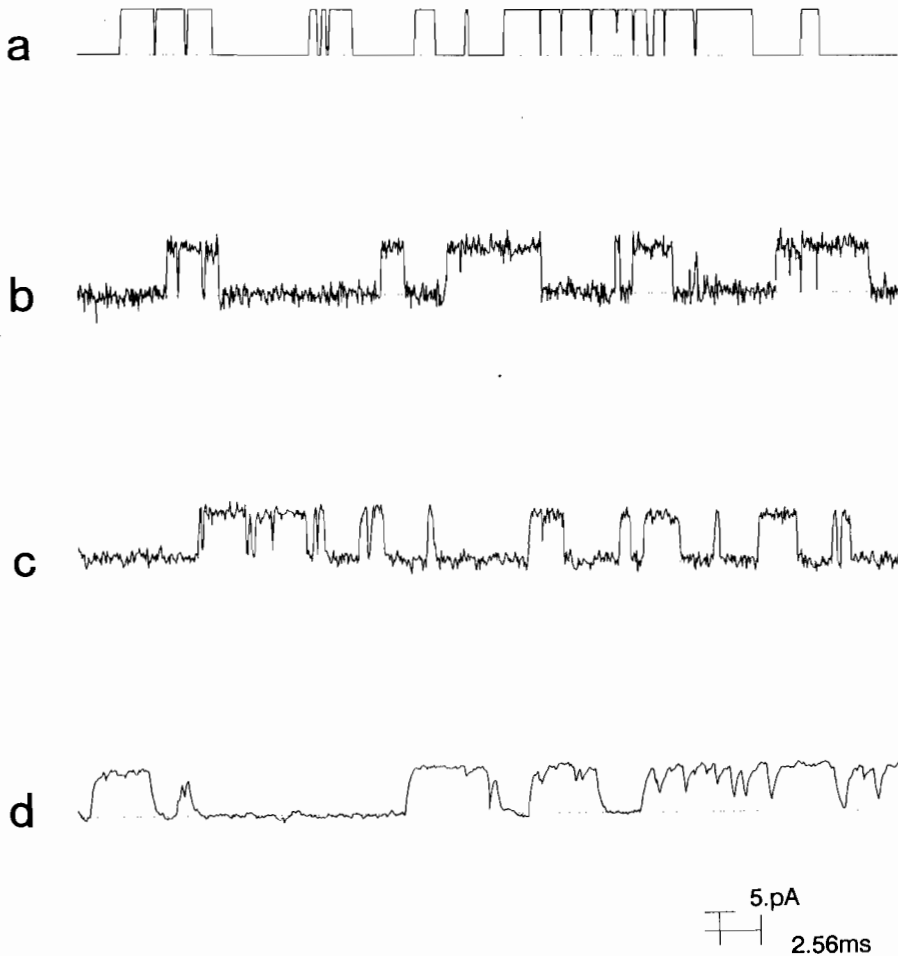


図5. 開閉時間の推定に与えるノイズとフィルタの効果. a, コンピュータ出力した理想的開閉のトレース(単一チャネル電流=1.30 pA, 平均開時間=1.03 ms, 平均閉時間=1.65 ms, 開確率=0.38). b, a にノイズ(rms=0.25 pA)を重ねたもの(平均開時間=0.607 ms, 平均閉時間=1.04 ms, 開確率=0.37). c, b に適当な ガウシアンフィルタ(偏差係数=0.5)をかけたもの(平均開時間=1.08 ms, 平均閉時間=1.85 ms, 開確率=0.37). d, a に強いフィルタ(偏差係数=0.9)を掛けたもの(平均開時間=1.95 ms, 平均閉時間=3.22 ms, 開確率=0.38).

(rms)のノイズを重畳したのが図5 bである. 一見影響はなさそうであるが, 50%いき値法で推定した平均開閉時間はそれぞれ 0.607 ms, 1.04 ms となり真の値より約40%小さな値になっている. そこでこのデータに適当なガウシアンフィルタをかけたのが図5 cで, このときの平均開閉時間は 1.08 ms と 1.85 ms になり, ほぼ真の値に復帰していることが分かる. ところが強くフィルタをかけすぎると原波形は大きく歪み, 平均開閉時間も 1.95 ms と 2.22

ms となって真値の約2倍になっている(図5 d). 持続時間の推定にいかんフィルタの設定が重要であるかがわかる. ではどのようにして適切にフィルタの遮断周波数を決めればよいのか? 実際には次のようにする. ベースラインに対して, 実際の開方向とは逆の方向にコンダクタンスレベル(-100%)を設定し, これに対して50%いき値レベル(-50%)を設定する. この状態で遷移検出を行い, ノイズによるみかけの開事象が検出できなくなるまでフィルタの遮

断周波数を下げる。こうしてノイズによる擬事象 (false event, 図 5 b) を防ぐことができる。言うまでもないが、この操作で高速開閉の未検出事象 (missing event) が生じることも忘れてはならない (図 5 d)。解析の目的に応じて適当なところで妥協するしかない。false event があるときには平均開閉時間が 2 重に過小評価されることに注意したい。つまり多数の短寿命の擬開閉事象と、それらによって長い開閉事象が中断されるためである。これに対して missing event があるときには開閉時間が過大評価されるが、missing した短い事象は後で述べる fitting によって外挿されるので false event と比べて誤差は少ない。

c) ベースラインの補正

これまではベースラインのドリフトを考慮しなかったが、実際にはフィルタでは除去できない低周波のゆらぎやドリフトが混入する場合がある。そのためにせつかく設定したいき値のレベルが意味をなさなくなる。これを自動的に補正する一つの方法として零クロス法がある⁷⁾。まずミニマムレベルを設定して、徐々にレベルを上昇させ、零クロスの数が最大値になるところをベースラインとする。つまりノイズの平均値レベルを探しながらそれをベースラインとする。しかしこの方法は、長い開事象や瀕回なバーストを含むデータでは必ずしも有効ではない。現在使われている一般的な方法では、一定の持続時間を有する閉事象の移動平均をとり直前の閉事象の平均値との間で重み付き平均を取ったものを新たなベースラインとする⁹⁾。例えば、直前のベースラインが 1 pA で、当該の開レベルの移動平均値が 2 pA の場合、その重みを 0.1 とすれば新たなベースラインは $1 \times 0.9 + 2 \times 0.1 = 1.1$ pA と計算される。多くのソフトウェアにはこうしたベースライン補正機能が付属しているので、状況に応じて利用できる。より精密な方法として time course fitting も提案されているが、かならずしも実用的ではない。興味がある方は文献¹⁰⁾を参照されたい。

以上、事象検出の方法と注意点を紹介したが、

いずれも完全ではない。最後の仕上げはやはり実験者が一つ一つの事象が正しく検出分類されているかを、目で見ながらチェックをして、アーチファクトを除去しなければならない。多くのソフトウェアにはこうした編集モードが付属している。

2) 開閉持続時間 (dwell time) の解析

a) dwell time histogram の作成

1) で検出された各事象ごとの dwell time の系列は event list とよばれ、ASCII ファイルとして保存できる。次の段階はこの list を、横軸に dwell time、縦軸に事象数というヒストグラムに整理することである。このときヒストグラムの bin 幅は事象数に応じて適切に設定する。解析したい最小の dwell time の 10~20% 程度に設定すれば良いとされている。また、後の指数関数へのあてはめ (fitting) を考えると、50~100ピン程度が望ましい。そのためには最低 1000 事象程度のデータがほしいところである。ただしこの方法は、精々 2 成分の指数関数で、それらの時定数が 1 桁程度の違いしかない場合にのみ信頼できると考えるべきである。もし、3 成分以上で、時定数の違いが 2 桁を超える場合は、短い成分から順に拡大して fitting するか、もしくは log-log あるいは log-square root プロット (図 6) によって速い時定数成分を強調しなければ、指数関数への信頼できる fitting は期待できない。その場合でも、種々の制限があるので、詳しくは文献を参照されたい¹¹⁾。

b) 指数関数への fitting

チャンネルの開閉反応はマルコフ連鎖過程とみなせるので、開閉持続時間の分布ヒストグラムは $f(t) = (1/\tau) \exp(-t/\tau)$ という確率密度関数で近似されると考えてよい。ここで $f(t)$ は持続時間 t の事象が出現する確率を表す確率密度関数で、 τ は持続時間 (寿命) の平均値に相当し、時定数と呼ばれる。これは次のように考えればよい。

今、closed $\xrightleftharpoons[k_2]{k_1}$ open という開閉反応を考えると、開状態の生存確率 (寿命) $F(t)$ について、 $dF(t)/dt = -\beta F(t)$ が成り立つ。これを積分す

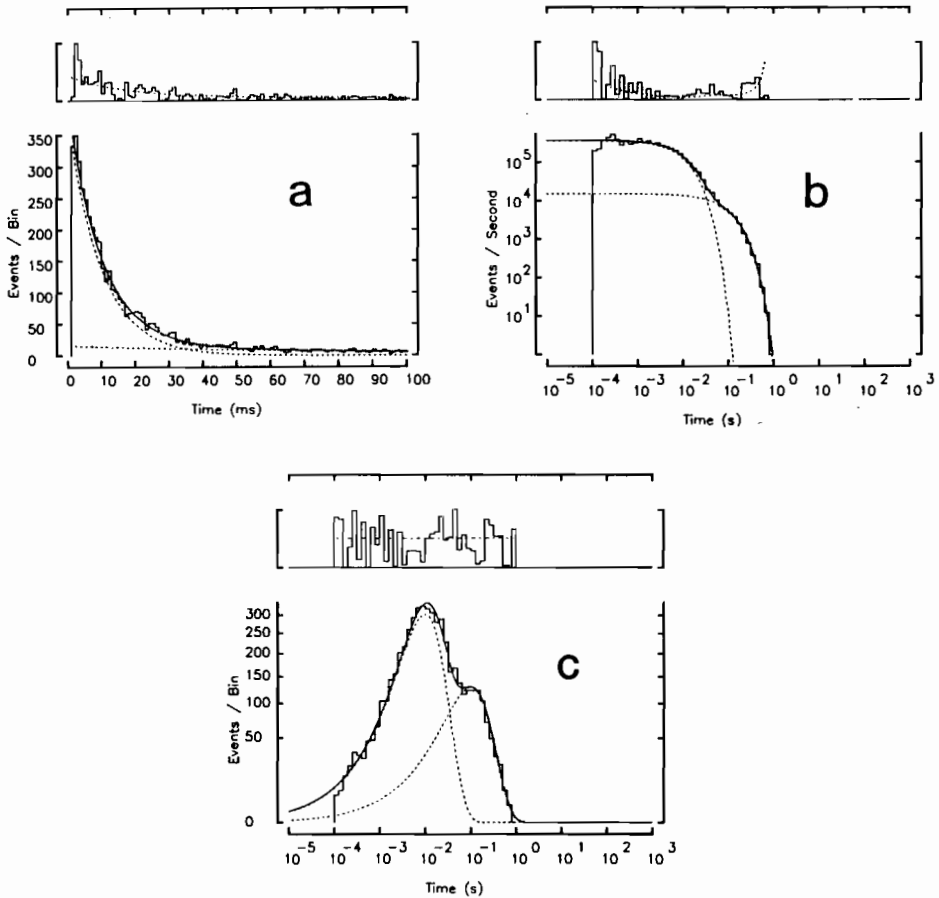


図6. 開閉時間(dwell time)ヒストグラムの様々なプロット法. a, 時定数 10 ms (頻度 = 70%) と 100 ms (頻度 30%) の分布をもつ 5120 のランダム事象を 1 ms きざみのビン幅で linear-linear プロットしたもの. 上段は理論値(破線)からの偏差をあらわす. このプロットでは 100 ms の成分が過小に評価されてしまう. b, log-log プロット. ここではビン幅が対数スケールで増加していく. ただし縦軸には事象数を各ビン幅で除した値が用いられている. c, 横軸は時間の対数, 縦軸に事象数の平方根をプロットしたもの. 上段の偏差が時間によらずほぼ一定になっていることに注意. 文献(11)より.

れば $F(t) = \exp(-\beta t)$ が得られる. 言い換えると $F(t)$ は開状態の寿命が t 以上である確率を表す. したがって寿命が t 以下である確率は, $1 - \exp(-\beta t)$ となる. これから寿命が t である確率, 即ち確率密度関数はこれを微分して $\beta \exp(-\beta t)$ となる. ここで $\beta \rightarrow 1/\tau$ と置き換えれば与式 $f(t) = (1/\tau) \exp(-t/\tau)$ を得る. 閉状態の寿命についても全く同様に考えることができ, 単に β を α に置き換えればよい. この例でもわかるように, その状態の平均寿命はそこから別の状態へ遷移する速度定数(一般的には

その和)の逆数になる. したがってこの反応モデルでは, ヒストグラムから時定数を求めれば速度定数が直接求められ, 反応の性質が決定できる.

コンダクタンスが区別できない閉(開)状態を複数個含むような反応では, 一般に閉(開)状態のヒストグラムは状態数 (n) に応じた複数の指数関数の重ね合わせとなり, 理論曲線は $f(t) = \sum_{i=1}^n (a_i/\tau_i) \exp(-t/\tau_i)$ と書ける. ただし a_i は各成分の総事象数に比例する相対頻度で, $\sum_{i=1}^n a_i = 1$ となる. 言い換えると a_i は各分布の面積の

割合に相当する。これは例えば上記関数の i 成分 ($f_i(t)$) のみについて 0 から ∞ まで積分した値 (その状態の出現確率) が a_i になることによって容易に確認することができる。この例のようにヒストグラムが複数の指数関数から構成される場合には、各反応速度定数は、一般に τ_i と a_i から成るかなり複雑な関数となる。簡単な例は次節で紹介する。

指数関数への fitting のアルゴリズムとしては Levenberg-Marquardt 法 (非線形最小 2 乗法)¹²⁾ が実用的であるが、データが少なくヒストグラムに空 bin があるようなときには誤差が大きくなる。この場合には最尤推定法 (most likelyhood method)¹³⁾ を使うほうが良い結果が得られる。ソフトウェアにはいずれを使うか選択できるものもあるが (pCLAMP. 6.0), 前者が付属するものが多い。何個の成分で fitting するかは結果をみながら試行錯誤で決めるしかない。

3) 反応モデルの決定

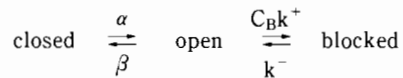
dwell time 解析の最終目標は、チャネルの開閉の反応モデルと各状態間の速度定数を決定することにある。先の dwell time histogram から得られた開閉各状態の時定数の数は、開閉各状態に含まれる状態数の最小値を与え、これが出発点となる。それらの状態を線形につなぐか環状にするか、あるいはその組合せにするかは容易には決められない。チャネルの性質や実験条件から試行錯誤的に決定するしかない。このとき良く使われるのが、シミュレーションを使った半経験的方法である。すなわち得られた状態数から適当な反応モデルを仮定し、dwell time histogram から得られた a_i と τ_i から速度定数を決定して、模擬的データを発生する。このデータから dwell time histogram を作成して、実際のデータとの比較をして最も適合度の良いモデルを決定する¹⁴⁾。反応モデルからチャネル電流のデータを発生するプログラム (CSIM) は Axon 社から販売されており、12 状態までのかなり複雑なシミュレーションをこなすことができる。ヒストグラムから得られる a_i , τ_i と反応

モデルの速度定数との関係を解く一般的方法は Colquhoun らによって与えられている¹⁵⁾。その解説は本稿の範囲を越えるので、ここではその原理を多少天下り的に要約する。

同一のコンダクタンスをもつ n 個の閉状態について考えると、閉状態の dwell time の確率密度関数は n 階の線形微分方程式に従う。これを直感的に分かり易く書き直すと、 n 個の閉状態に関する 1 階の連立微分方程式になる。このとき連立微分方程式の係数 (各状態間の遷移速度定数からなる) は n 次の正方行列を構成する (次節 * 参照)。さて n 階の線形微分方程式の一般解は $f(t) = \sum_{i=1}^n w_i \exp(-\lambda_i t)$ となる。ここで $\lambda_i = 1/\tau_i$ と置けば τ_i は前節で述べた時定数に相当する。 λ_i は n 階微分方程式の特性方程式 ($df(t)/dt^i$ を λ^i に置き換えてつくられる n 次方程式) の根として求まり (行列表現の場合は λ_i は行列の固有値として求められる), w_i (ここでは $\sum_{i=1}^n w_i / \lambda_i = 1$) は初期値から決まる。これが、dwell time histogram が指数関数の線形和として近似できる (5-2-b 節) 数学的根拠である。一般に状態数が 3 を越えると、 λ_i と速度定数の関係は非常に複雑になり、行列法で解くのが効率的であるが、詳しくは文献を参照されたい¹⁵⁾。ここでは、open channel blocking を表す簡単なモデルの解析例を紹介するとどめる。

4) オープンチャネルブロッキングの解析例

解析するモデルは、



である。ここで C_B はブロッカーの濃度を表す。この反応から得られる単一チャネル電流は、閉状態のなかに短いブロッキングが挿入されたバースト状のトレースを示す。この反応では一般に closed state と blocked state のコンダクタンスの区別はつかないので、closed dwell time histogram は blocked state に起因する短い時定数 τ_B とバースト間の真の closed state に起因する長い時定数、 τ_c をもつはずである。これ

に対して open dwell time histogram は、時定数 (τ_o) の単一の指数関数になる。これらの時定数は、容易に $\tau_B = 1/k^-$, $\tau_c = 1/\alpha$, $\tau_o = 1/(\beta + C_B k^+)$ と求められる。これから closed dwell time のヒストグラムを近似する確率密度関数 $f(t)$ は、前節を参考にして、 $f(t) = a_1 k^- \exp(-k^- t) + a_2 \alpha \exp(-\alpha t)$ とかける。 a_1 と a_2 はそれぞれ blocked state と closed state の存在確率(相対頻度)であるから、速度定数 β と $C_B k^+$ を用いて $a_1 = C_B k^+ / (\beta + C_B k^+)$, $a_2 = \beta / (\beta + C_B k^+)$ とかける。これらの関係から4つの速度定数 (α , β , k^+ , k^-) がすべて実験値から決定される ($\alpha = 1/\tau_c$, $\beta = a_2/\tau_o$, $k^+ = a_1/\tau_o C_B$, $k^- = 1/\tau_B$)。

ちなみに k^-/k^+ はブロッカーの解離定数 (K_B) に相当する。また簡単な計算により、1バースト当りの平均総開時間は $1/\beta$, 平均総閉時間は $C_B/K_B \beta$ となる。これから、平均のバースト時間は、 $(1 + C_B/K_B)/\beta$ と求められる¹⁶⁾。

*) **Q** 行列による解法

前出の反応モデルにおいて、open, blocked, closed の各状態の存在確率をそれぞれ O, B, C とすれば、その時間変化を表す微分方程式は以下のようになる。

$$\begin{aligned} dO/dt &= -(\beta + C_B k^+)O + k^-B + \alpha C \\ dB/dt &= C_B k^+ O - k^-B \\ dC/dt &= \beta O - \alpha C \end{aligned}$$

これを行列表現すれば

$$\begin{pmatrix} O' \\ B' \\ C' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -(\beta + C_B k^+) & k^- & \alpha \\ C_B k^+ & -k^- & 0 \\ \beta & 0 & -\alpha \end{pmatrix} \begin{pmatrix} O \\ B \\ C \end{pmatrix}$$

となる。ここで右辺の列ベクトルを前に移動すると、行列は転置されて

$$\begin{pmatrix} O' \\ B' \\ C' \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} O \\ B \\ C \end{pmatrix} \begin{pmatrix} -(\beta + C_B k^+) & C_B k^+ & \beta \\ k^- & -k^- & 0 \\ \alpha & 0 & -\alpha \end{pmatrix}$$

となる。この転置行列を特に **Q** 行列と呼ぶ。右

辺の列ベクトルを **P** とすれば、上式は

$$d\mathbf{P}(t)/dt = \mathbf{P}(t) \cdot \mathbf{Q}(t)$$

とまとめられる。ちなみにこの一般解は $\mathbf{P}(t) = e^{\mathbf{Q}(t)}$ である。あとは行列演算の常法に従って **Q** 行列 (実際には $-\mathbf{Q}$) の固有値 (λ_i) を決めていくことになる。ここでは開と閉に分離された dwell time histogram との対応を取るために上記の **Q** 行列を、それぞれ 開 (O) と 閉 (B, C) に対応する小行列 (**A**, **B**) に分離して (破線), 各々の固有値を固有方程式 ($|\mathbf{A} - \lambda \mathbf{I}| = 0$, $|\mathbf{B} - \lambda \mathbf{I}| = 0$; ただし **I** は単位行列) から決定する。この例では **A** は 1 次行列, **B** は対角行列なので、計算するまでもなくそれぞれの固有値は、 $(\beta + C_B k^+)$ および k^- , α となり先に求めた結果と一致することが分かる。この方法 (**Q** 行列法) は、**Q** 行列さえ作れば複雑な反応モデルの解析にも使うことのできる一般的な手法である。そこで **Q** 行列の簡単な作り方を紹介する。

先の転置行列の対角要素を 0 とした行列

$$\begin{matrix} & O & B & C \\ O & \left[\begin{matrix} 0 & C_B k^+ & \beta \\ k^- & 0 & 0 \\ \alpha & 0 & 0 \end{matrix} \right] \\ B & & & \\ C & & & \end{matrix}$$

をよく眺めれば、i(行)からj(列)への遷移行列になることが分かる。また先の転置行列の対角要素は各状態の寿命(時定数)に負号をつけたものになっている、つまり各行の和はゼロになっている。言い換えると各行の対角要素は遷移行列(これは反応モデルから即座に構成できる)の行要素の和に負号をつけるだけで求められるわけである。複雑な行列の固有値の計算は適当なプログラムパッケージに任せるのが賢明である。

6. おわりに

振幅解析までは比較的スムーズに進むが、dwell time の解析は非常に時間がかかるうえに、最後まで確信が持たにくいというのが筆者の感想である。しかし一方でチャネル蛋白質の構造も次第に明かとなり、部位特異的突然変異

によって自在に構造変化が導入できるようになってきた。そのときの微妙なコンダクタンスやゲーティングの変化を解析することによって分子レベルの本格的な構造機能連関の研究が可能になりつつある。その意味で単一チャネルデータ解析はますます重要になってきた。本稿が、これからイオンチャネルの構造機能連関を明らかにしようという研究者の方々に多少ともお役に立てば幸いである。

文 献

- 1) Miller, C. (ed.) (1986) "Ion Channel Reconstitution", Plenum, New York
- 2) Sakmann, B. & Neher, E. (eds.) (1983) "Single-Channel Recording", Plenum, New York
- 3) 岡田泰伸, 小原正裕 (1994) バッチクランプ法の原理と実際. 日本生理学雑誌, **56** (5), 133-145
- 4) Patlak, J. B. (1988) Sodium channel subconductance levels measured with a new variance-mean analysis. *J. Gen. Physiol.* **92**, 413-430
- 5) Hille, B. (1992) "Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd ed.", Sinauer, Sunderland, MA.
- 6) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1983) The principles of the stochastic interpretation of ion-channel mechanisms. In "Single-Channel Recording" (Sakmann, B. & Neher, E. (eds.)), pp. 135-189
- 7) Sachs, F., Neil, J. & Barkakati, N. (1983) The automated analysis of data from single ionic channels. *Pflüger. Arch.* **395**, 331-340
- 8) Dempster, J. (1993) "Computer Analysis of Electrophysiological Signals" Academic Press, London. pp. 167
- 9) Colquhoun, D. (1987) Practical analysis of single channel records. In "Microelectrode techniques. The Plymou Workshop Handbook" (Standen, N. B. Gray, P. T. A. & Whitaker M. J. (eds.) Company of Biologist Ltd. Cambridge, pp. 83-104
- 10) Sigworth, F. J. & Sine, S. M. (1987) Data transformations for improved display and fitting of single channel dwell time histograms. *Biophys. J.* **48**, 149-158.
- 11) Jackson, M. B. (1992) Stationary single-channel analysis. *Method Enzymol.* **207**, 729-746
- 12) 中川徹, 小柳義夫 (1982) "最小二乗法による実験データ解析" 東大出版会, 東京
- 13) 栗屋隆 (1991) "データ解析, 第2版" 学会出版センター, 東京
- 14) French, R. J. & Wonderli, W. F. (1992) Software for acquisition and analysis of ion channel data: choices, tasks, and strategies. *Method Enzymol.* **207**, 711-728
- 15) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1981) On the stochastic properties of single ion channels. *Proc. R. Soc. London B*, **211**, 205-235
- 16) Colquhoun, D. & Hawkes, A. G. (1983) On the stochastic properties of bursts of single ion channel openings and clusters of bursts. *Phil. Trans. R. Soc. London B*, **300**, 1-59