



# Vision

## イオンチャネルの小史 (brief history)

イリノイ大学医学部シカゴキャンパス 薬理学教室

中島重廣

Hodgkin-Huxley の論文 (J. Physiol. **116**, 424, 1952 ; **116**, 449 ; **116**, 473 ; **116**, 497 ; **117**, 500, 1952) が出来てから約 50 年経過した。現在イオンチャネルの三次 (tertiary) 四次 (quaternary) 構造, 及びその機能との相関が分かってきた。この間, どのような画期的発見が起きたかを考えてみた。歴史は“書かれる”ものだというのを聞いたような気がする。以下は私自身の主観に基くものである。

### (a) Hodgkin-Huxley のイオン説 (A.L. Hodgkin ; A.F. Huxley)

1952 年に A.L. Hodgkin と A.F. Huxley は大きな影響を及ぼす論文を発表した。彼等は, イカの巨大神経の活動電位を電圧固定法で解析した。まず細胞膜の  $K^+$  透過性及び  $Na^+$  透過性 (又はコンダクタンス) を定義し, これらのパラメータを電圧と時間の関数として表現した。この結果, この 2 つのパラメータにより活動電位のほとんどすべての属性が定量的に説明されることを示した。

今から振り返ってみると, これはあたりまえのように見えて, その重要性が理解出来ないかも知れない。

私は 1951 年に医学部で興奮性生理学の講義を聞いた。それは Hodgkin-Huxley の論文が出る以前のことで, 余り魅力のある学問とは思えなかった。電流を神経や筋にかけるとその極性により興奮性が上がったり, 下がったりする。興奮性とは

閾値逆数である。クロナキシーというわかりにくい現象もあった。ひとこと言って, 興奮の閾値の変化を精密に解析したものが大部分であった。私は 1957 年に基礎医学の研究をする決心をして, 若林勲教授の生理学教室に入った。最初の一年間はそのころのしきたりで, 電気工学科に国内留学をし, 1958 年に生理学教室にもどった。この時に Hodgkin-Huxley の 5 つの論文をていねいに読んだが, これは非常に驚きであった。興奮性膜の生理学は完全に異なった世界に入ったのである。(ちなみに江橋節郎教授は Hodgkin-Huxley を読んで, もう興奮性膜の生理学の重要なことは終わったと感じられて, 筋収縮を始められたとのことである)。

Hodgkin-Huxley は膜のイオン透過性 (又はコンダクタンス) という概念から出発した。これは巨視的概念で個々のイオンチャネル機能の集合体であり, 後にこれはもっと微細な概念, すなわち個々のイオンチャネルの集合として記述されるようになった (Hodgkin and Keynes, J. Physiol. **128**, 61, 1955)。このようにして興奮性生理学はイオンチャネルの学問という世界に入っていたのである。

イオンチャネルは電圧ゲートのもの他にリガンドゲート (ligand-gated) のものもある。リガンドゲートチャネルを Hodgkin-Huxley のイオン学説を基礎にして記述, 分析したのが, J.C. Eccles, B. Katz, S.W. Kuffler 等の業績であった。

(b) 選択フィルター (selectivity filter) B. Hille ; C.M. Armstrong ; F. Bezanilla (Hille, J. Gen. Physiol. **58**, 599, 1971 ; **61**, 669, 1973 ; Bezanilla and Armstrong, J. Gen. Physiol. **60**, 588, 1972)

K<sup>+</sup>チャネルはなぜカリウムイオンだけを通すのか？この問題に関してはHodgkin-Huxleyは記述していない。B. Hilleは1971年から73年にかけての実験と理論により、これを解決した。Hilleは系統的に多種類の無機及び有機イオンを使い、個々のイオンの透過性を実験で決定した。この実験結果に基づいてHilleは次のような理論を提出した。K<sup>+</sup>イオンは水の中では水分子の陰性極(O<sup>-</sup>)に囲まれている。これによってK<sup>+</sup>は安定な状態(低いエネルギーレベル)に保たれている。K<sup>+</sup>がK<sup>+</sup>チャネルの選択フィルターを通るときは水のO<sup>-</sup>の代理(surrogate)としてチャネルの内壁にあるcarbonyl基のO<sup>-</sup>を利用する。このようにしてK<sup>+</sup>は割合安定な状態で選択フィルターを通過することが出来る。

Na<sup>+</sup>はK<sup>+</sup>よりも小さいのであるが、これが災いして、K<sup>+</sup>チャネルのcarbonyl基O<sup>-</sup>と相互作用(interaction)が充分出来ず、エネルギーの高い不安定な状態になり、チャネルの中に入れないでもとの水の中へもどってしまう。この考えはNa<sup>+</sup>イオンに関しては1971年にHilleが、そしてK<sup>+</sup>イオンについては、1972年にBezanilla & Armstrong, 又更に1973年にHilleが提出した。この考えはすぐ一般に受け入れられ、30年後にMacKinnon達のX線回折の結果がこれを支持することになる。

(c) ゲート機構 : C.M. Armstrong ; F. Bezanilla (Nature **242**, 459, 1973)

Voltage-gated channelsでは膜が脱分極すると、チャネルが開きイオンが通過する。この機構は何であろうか？もっと一般化すると、チャネルはどのような機構で閉じたり開いたりするのであろうか。この問題について、Hodgkin-Huxleyは次のような仮説を提出した。脱分極になると膜の中に存在する電荷を持った物質が膜のある部分に

移動する。これがチャネルが開く原因になる。

もしこの仮説が正しければ、この仮想物質が膜を動くときには小さな電流(ゲート電流)が記録されるはずである。しかし長い間この仮想のゲート電流を観察した人はいなかった。このゲート電流はArmstrong-Bezanilla(1973)によって初めて発見された。このゲート電流を精密に分析していくと、Hodgkin-Huxleyのkineticsは大分修正を受けることになった。しかし一番大切なことは、この発見によりゲートが開いたり閉じたりするときに膜の中を電荷が動くことが指摘されたことである。

ゲート電流の存在の場は10年を経てからチャネルの構造解明により(Numa等; MacKinnon等)更にはっきりすることになる(Noda et al., Nature **312**, 121, 1984 ; Jiang et al., Nature **423**, 33, 2003)。

(d) 単一チャネル記録法 Neher-Sakmann (Hamill et al., Pflügers Arch. **391**, 85, 1981)

生物膜に内在(endogenous)の単一チャネルを流れる電流は非常に小さくこれを記録することは不可能であった。しかし、多数のチャネルが活動するときに出るノイズをフーリエ解析して単一チャネルの電流を計算することは1971年頃から行われていた(Katz and Miledi, Nature **232**, 124, 1971 ; Anderson and Stevens, J. Physiol. **235**, 655, 1973)。一方1981年頃Neher-Sakmannはパッチクランプ法により単一チャネルの電流をリアルタイムで記録することに成功した。パッチクランプ法が発明される以前は1nAより小さい電流を記録することは困難であったが、Neher-Sakmannにより、1pAという小さな電流の記録が可能になった。

単一チャネル記録法の確立の寄与したことは何であろうか？第1にイオンチャネルの開閉のkineticsがより精密に判ってきた。第2に種々のイオンチャネルの差がはっきり判るようになったのでチャネルの分類がもっと細かく正確になってきた。(例えば、種々のCa<sup>2+</sup> channel), 第3にイオンチャネルの存在がはっきり眼の前で見ることが

可能になった (Seeing is believing).

(e) イオンチャネルの構造：一次構造：S. Numa (Noda et al., Nature **302**, 528, 1983 ; その他), L.Y. Jan and Y.N. Jan (Tempel et al., Science **273**, 770, 1987)

蛋白の一次構造の解析はほとんどDNA シークエンスの解明に依存している。イオンチャネルのDNA シークエンスはS. Numaを中心とする京都大学の科学者達の功績である。Numaはニコチン性アセチルコリン受容体チャネル, Na<sup>+</sup>チャネル, Ca<sup>2+</sup>チャネルと次々に重要なイオンチャネルの一次構造の決定に成功した。ちなみにNumaはSakmannと協同研究をすることにより, 国際間の協同研究がイオンチャネルの領域でも個人の間の意志で簡単に出来ることを示し, 我々の学問に良い模範を示した。

Numaがクローニングを成功させた原因の一つは, そのころにはすでに生化学の手法を用いて, ある種類のイオンチャネルの一部分の一次構造がもう分かっていたからである。すでに分かっている構造からプローブを作り, ハイブリダイゼーション法を用いてDNAの全長を決定して行ったのである。しかしこの方法はK<sup>+</sup>チャネルには使う事が出来なかった。K<sup>+</sup>チャネルの構造がほとんどわかっていなかったからである。L.Y. JanとY.N. JanはK<sup>+</sup>チャネルの欠損している*Drosophila*のミュータント (*Shaker*) のクロモゾームの場所からDNAを決定することに成功した。イオンチャネルでこの方法で成功したのは初めてのことである。

*Shaker*がクローンされたことにより, かぞえきれない程の種々のファミリーのK<sup>+</sup>チャネルがhomology-cloningで発見され, 機能発現法も用いられた (Inward rectifier K<sup>+</sup> channelを含む, Kubo et al., Nature **362**, 127, 1993 ; Dascal et al., PNAS, **90**, 10235, 1993)。しかもK<sup>+</sup>チャネルは生理的, 病理的な役割が大きいので, 今ではもっとも研究されつつあるイオンチャネルと言える。L.Y. JanとY.N. Janはこの基礎を築いたのである。

(f) イオンチャネルの三次, 四次構造：R. MacKinnon (Doyle et al., Science **280**, 69, 1998)

最近まではイオンチャネルを含めて膜内在性タンパク (membrane integral protein) を結晶化することは不可能という悲観的な考えが一般を支配していた。このような考えを打ち破って, K<sup>+</sup>チャネルのX線回折に成功したのはR. MacKinnonであった。彼はM.D.であるが臨床を止め, 電気生理の実験を行うためにC. Millerの研究室に入り, 数年後にはHarvardの正教授になり, 今まで自分でやったことのないX線回折をやるべくRockefeller大学の正教授になった。

最初の回折の論文ではバクテリアのK<sup>+</sup>チャネルの膜内全体構造を記載し, とくにselectivity filterの存在を確かめた。ここではcarbonyl oxygenがselectivity filterを形成していることを示し, Hille, Armstrong, Bezanillaのモデルが正しいことを証明した。又, selectivity filterをK<sup>+</sup>イオン (又はRb<sup>+</sup>イオン) が約2つづつ通過しているのを証明した (この事実はHodgkin-Keynesが1955年に予測している)。

MacKinnonの最近のvoltage-gated K<sup>+</sup> channelに関する論文では (Jian et al., Nature **423**, 33, 2003), S<sub>4</sub> segmentがS<sub>3</sub> segmentの一部と一緒に, paddleのような状態になっている。電圧を変化させることのpaddleが大きく動き回転することを記載している。これがK<sup>+</sup>チャネルのゲートを開閉させているという結論である。この結論には異論もあるが, Numa等の予言をまさに証明したことになる。

## 結 び

以上の6つの研究はいずれもすばらしい発見で, 各々がノーベル賞に値する仕事であろう。事実3つの仕事はノーベル賞を受けている。この中でもHodgkin-Huxleyの仕事は我々の興奮性膜を考える観点を革命的に変化してしまったといえる。Hodgkin-Huxleyの仕事がなければ, イオンチャネルという出発的概念がない。すなわちHodgkin-Huxleyは興奮性膜を解析するための座

標を我々に与えたといっても良い。Harveyの仕事，Mendel-Morganの仕事，Franklin-Wilkins-Watson-Crickの仕事と同じレベルの仕事と言って良いと思う。

(この原稿を書くにあたり，生理学研究所の岡田泰伸教授，久保義弘教授及びイリノイ大学の中島泰子教授から有益なアドバイスを頂きました。深く感謝致します。)