

# LECTURES

## “NEURON”を用いた計算機シミュレーション： マルコフ状態遷移過程に基づくチャンネルのキネティックモデル

熊本大学大学院・自然科学研究科・情報電気電子工学

林田 祐樹

### はじめに

ご存知の方も多いように、NEURONは、生体細胞の電気化学的な挙動を計算機上でシミュレートするためのソフトウェアとしてネット上に公開され、神経細胞や筋細胞の数理モデルを用いた定量解析に広く活用されている。筆者自身も10年ほどにわたって愛用しているが、NEURONの持つ機能は年々更新・追加されており、現在も進化を続けている。基本的なNEURONの使用方法については、生理学会雑誌第63巻7, 8号(2001)のLECTURESに掲載の『“NEURON”による神経機能のシミュレーション』に詳しく書かれているのでそちらを参考にして頂く事とし、ここではイオンチャンネルのキネティックモデルに注目しながら、筆者が行った実際の解析例について概説したい。

### Hodgkin-Huxleyモデルとチャンネルキネティクス

計算機シミュレーションにおいて、チャンネルを介したイオン電流を記述する際には、Hodgkin-Huxleyモデル(H-Hモデル)が頻繁に用いられる。H-Hモデルは、式の構造が比較的簡単でその挙動が直感的にも理解し易く、実験データからモデルに含まれるパラメータの値を推定する際にもその手順が過去の研究により明快に示されているため、多様なイオン電流のモデリングを行う上で非常に実用的であると言える。しかし一方で、チャンネルのキネティクスに関してメカニスティックに正確な記述ではないため、特に不活性化や脱感作などを示すチャンネルのモデリングにおいては限

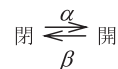
界がある。また、チャンネルノイズに起因する膜電位変動、神経伝達物質によるチャンネルキネティクスの調節、神経毒やその他の薬物のチャンネルに対する作用メカニズムなどをシミュレートしたい場合には、チャンネルの状態遷移過程を直接表現した記述の方が使い易いことがある。当然ながら、H-Hモデルを方程式の形から、チャンネルの状態遷移過程の記述表現に変換することも可能ではある。例えば、H-Hモデルの元の考えに従い、電位駆動型 $\text{Na}^+$ コンダクタンス $g_{\text{Na}}$ を

$$g_{\text{Na}} = m^3 \cdot h \cdot \bar{g}_{\text{Na}}$$

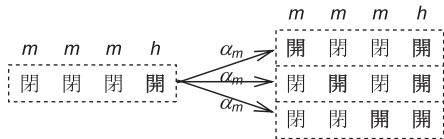
とおくと、 $\text{Na}^+$ チャンネルのキネティクスは、互いに独立な3つの活性化ゲート( $m$ )と、それらと独立した1つの不活性化ゲート( $h$ )により制御されると仮定される( $\bar{g}_{\text{Na}}$ は $\text{Na}^+$ コンダクタンスの最大値)。ここでゲート変数 $m$ と $h$ は0から1までの値をとり、その時間変化は

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m \cdot (1-m) - \beta_m \cdot m, \quad \frac{dh}{dt} = \alpha_h \cdot (1-h) - \beta_h \cdot h$$

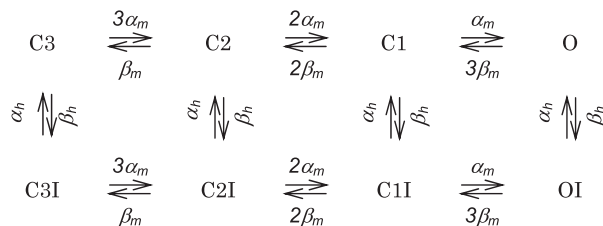
で与えられる。これは下図のように、各ゲートが2つの状態(例えば“閉”と“開”)の間を速度係数 $\alpha$ と $\beta$ で確率的に遷移すると解釈される。



次にチャンネルとしての状態を考えてみる。まず例えば、3つ全ての活性化ゲートが“閉”且つ不活性化ゲートが“開”の状態から、いずれか1つの活性化ゲートが“開”の状態へ遷移する場合を図にすると、



となる。ここで3つの活性化ゲートには違いがなく（つまり同じゲートが単純に3つ存在し）、互いに独立であるという仮定を踏まえると、上図の右の3つの状態をまとめて1つの状態、例えば“C2”とおき、左の状態を“C3”とおくことによ



と表すことができる。ここで上段の“C3”、“C2”、“C1”はチャンネルの“closed”の状態であり、“O”は“open”の状態、下段の“C3I”から“OI”は上段の各状態に対応する“inactivated”の状態を表している。もしこれをNEURON上でシミュレートしたい場合には、Na<sup>+</sup>電流の.modファイルのキネティクスを記述する部分で、以下のようなプログラムブロックを書けば簡単に実現できる。

```

KINETIC kstates {
  ~ C3 <-> C2 (3*Am,Bm)
  ~ C2 <-> C1 (2*Am,2*Bm)
  ~ C1 <-> O (Am,3Bm)
  ~ C3I <-> C2I (3*Am,Bm)
  ~ C2I <-> C1I (2*Am,2*Bm)
  ~ C1I <-> OI (Am,3Bm)
  ~ C3 <-> C3I (Bh,Ah)
  ~ C2 <-> C2I (Bh,Ah)
  ~ C1 <-> C1I (Bh,Ah)
  ~ O <-> OI (Bh,Ah)

  CONSERVE C3+C2+C1+O+C3I+C2I+C1I+OI = 1
}

```

ここでAm, Bm, Ah, Bhは各々 $\alpha_m, \beta_m, \alpha_h, \beta_h$ を表す。

ただし本節冒頭に述べたとおり、Na<sup>+</sup>チャンネルのキネティクスに関して、不活性化はそれ自体には膜電位依存性がほぼ無く活性化に連動して起

り、



と書き直すことができる。ここでは、“C2”として3つの状態組み合わせの論理和をとるため、“C3”から“C2”への遷移確率（すなわち確率的遷移の速度係数）は $\alpha_m$ の3倍となる。同様に考えると、チャンネルは全部で8つ状態を取りうることになり、その状態遷移過程は、

ること（Armstrong & Bezanilla 1977；Bezanilla & Armstrong 1977），“slow”や“ultra-slow”などと呼ばれる時間経過の異なる複数の不活性化過程が存在すること（Chandler & Meves 1970；Rudy 1975；Fox 1976）などが従来から示されており、その議論は現在も絶えない（cf. Toib et al. 1998；Ellerkmann et al. 2001）。従ってNa<sup>+</sup>チャンネルに限らず、シミュレーション解析においては、様々なレベルの数理モデルの中から取り扱う問題の程度に適したものを選択することも重要であろう（e.g. Jones 1999；Destexhe & Huguenard 2000）。

### T型Ca<sup>2+</sup>チャンネルのキネティックモデル

電位駆動型イオンチャンネルの活性化過程における膜電位依存性は、チャンネルの分子構造内にあるS4膜貫通部位が電圧センサーとして働くことにより決定付けられると考えられる。すなわち、チャンネルの $\alpha$ サブユニットを構成するIからIVのドメイン内に正電荷を帯びたS4セグメントが存在し、これらが膜電位変化により何らかの物理的変位を生じることでチャンネルのコンフォメーションが変化し、これによりイオンの通過孔の開閉が制御されているものと仮定される。Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>

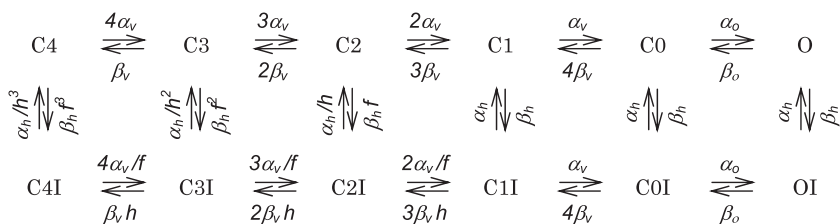
の各電位駆動型イオンチャンネルにおいて同様の膜電圧センサーが存在しており、チャンネルの活性化に関しては定性的にはほぼ同じ状態遷移過程を考えることができる [但しドメイン間でS4の変位速度が異なっているとの報告もあり (Chanda & Bezanilla 2002), 定量的には未だ不明な点が多い]. 不活性化のキネティクスに関しては, 巨視的イオン電流の挙動において見かけ上の膜電位依存性を示すT型Ca<sup>2+</sup>チャンネル (以下“Tチャンネル”と呼ぶ) がNa<sup>+</sup>チャンネルと共に例として挙げられることが多い. Tチャンネルのバイオフィジカルな特性に関しては, 近年のクローニングにより卵母細胞やHEK293を用いた発現系において詳細な実験的解析が可能になり (Cribbs et al. 1998; Lee et al. 1999; Perez-Reyes et al. 1998), その結果十分な実験データを基に比較的信頼性の高いキネティックモデルが構築されるまでに至っている (Burgess et al. 2002; Frazier et al. 2001; Serrano et al. 1999). また少ないながら, ネイティブな神経細胞に存在するTチャンネルに関しても同様のモデルが適用された例がある (Kuo & Yang 2001; Lee, Hayashida & Ishida 2003). 以下では, 筆者が網膜神経節細胞に存在するTチャンネルの解析に用いた, マルコフ状態遷移過程を持つキネティックモデルについて説明する.

ここで紹介するモデルは, 不活性化過程が活性化にアロステリックに結合しているとするNa<sup>+</sup>チャンネルのキネティックモデル (Kuo & Bean 1994) を元に, その構造をTチャンネルに適合するようにして得られたものである (Serrano et al. 1999; Lee, Hayashida & Ishida 2003). 下図にその状態遷移過程を示す.

ここでチャンネルの取りうる各状態の意味は, 前節で述べたH-H型Na<sup>+</sup>チャンネルの場合とほぼ同様であり, 上段の“C4”から“C0”は“closed”, “O”は“open”, 下段の“C4I”から“OI”は上段に対応する“inactivated”の状態である. 遷移速度係数 $\alpha_v, \beta_v$ は膜電位の関数であり, 膜電位 $V_m$ を用いて

$$\alpha_v = \alpha_{v0} \cdot \exp(V_m/V_{\alpha_v}) \quad , \quad \beta_v = \beta_{v0} \cdot \exp(V_m/V_{\beta_v})$$

で与えられる.  $\alpha_{v0}$ と $\beta_{v0}$ は膜電位0mV時の遷移速度であり, 膜電圧センサーの変位速度と捉えることもできる. また $V_{\alpha_v}$ と $V_{\beta_v}$ は電位定数であり, 膜電圧センサーの変位に伴うゲート電荷と対応付けて考えられる. その他の遷移速度係数 $\alpha_o, \beta_o, \alpha_h, \beta_h$ 及びアロステリック結合係数 $f, h$ は定数である. 従って活性化過程の状態遷移は膜電位に依存するが, 不活性化過程の遷移は膜電位に直接は依存せず, 活性化過程の“状態”に依存して起こることになる (“state-dependent inactivation”と呼ばれる). 膜電位が脱分極するに従って, チャンネルの状態遷移の確率は図の右方向へ高くなり活性化が進む. 不活性化は活性化が進むほどに, 逆に不活性化からの回復は脱活性化が進むほどに促進される. この活性化と不活性化のアロステリックな結合は係数 $f$ と $h$ により左右され, この値が1に近づくほど不活性化の“状態”依存性は小さくなる. ただしチャンネルの状態が図中の右側の2つの“closed”および“open”に至ると不活性化過程の遷移速度は飽和することになる. また筆者が用いたモデルでは, チャンネルの最終的な開閉 (“C0”と“O”との間の遷移) は両方向共に膜電位に依存しないと仮定した.



このキネティックモデルの挙動は、全部で10のパラメータにより決定され、それらの値は膜電位固定実験により whole-cell 電流計測のデータから推定することができる。例えば不活性化の速度定数である  $\beta_h$  の値は、チャンネルをほぼ完全に脱活性化させるような過分極レベルを保持電位とし、そこから活性化が最大となるような脱分極レベルへステップ状に電位固定することにより、チャンネルの状態を“C4”から“O”を経て“OI”の状態へ素早く遷移させ、そのとき観測される電流の減衰の時定数から直接導出される。シミュレーションを行いながらのイタレーションは必要だが、その他のパラメータ値についても種々の実験データから推定可能である。我々の場合、細胞内調整因子の影響を考え、実際の膜電位固定実験では穿孔パッチ記録法を適用した。但しこの記録法

では時としてパッチ膜上のアクセス抵抗のため、ステップ状電位固定の時間遅れや電位固定エラーが問題になることがある。そこでパッチクランプアンプで補償しきれなかった分の電極容量及びアクセス抵抗も含めてシミュレーション解析を行った。また実験では良好な space-clamp を得るために単離細胞試料の中でもほぼ細胞体のみのもを計測に用い、計算機シミュレーションにおいても細胞形態は球体とした。このように実験とモデルとの間でできるだけ整合を取るようになればパラメータ推定の信頼性も上がると考えられる。そのほかパラメータ推定の際の規範条件などに関して詳しくは筆者らの論文を参考にして頂きたい (Lee, Hayashida & Ishida 2003)。

Tチャンネルを通る  $Ca^{2+}$  電流をシミュレートするには Goldman-Hodgkin-Katz (G-H-K) 方程式：

$$I_{Ca_T} = P_{Ca} \cdot O \cdot \frac{z^2 \cdot F^2 \cdot V_m}{R \cdot T} \left( \frac{[Ca^{2+}]_{in} - [Ca^{2+}]_{out} \cdot \exp\left(-\frac{z \cdot F \cdot V_m}{RT}\right)}{1 - \exp\left(-\frac{z \cdot F \cdot V_m}{R \cdot T}\right)} \right)$$

を適用し、 $Ca^{2+}$  濃度依存的な整流作用を考慮することもできる。ここで  $P_{Ca}$  はイオン透過率 [cm/sec]； $O$  はチャンネルが“open”の状態を取る割合； $[Ca^{2+}]_{in}$ 、 $[Ca^{2+}]_{out}$ 、 $z$  は各々、 $Ca^{2+}$  の細胞内濃度、細胞外濃度、価数； $F$ 、 $R$ 、 $T$  は各々、ファラデー定数、気体定数、絶対温度である。Tチャンネルの一価陽イオンに対する透過性 (Fukushima & Hagiwara 1985；Lux et al. 1990) を考慮する必要がある場合にも同様の G-H-K 方程式を適用すればよい。ただし式からも分かる通り膜電位  $V_m$  が 0mV に近づくと解が数値計算上不安定になるため、実際のプログラムでは、

```
ica = PCa * O * ghk(v, cai, cao)
```

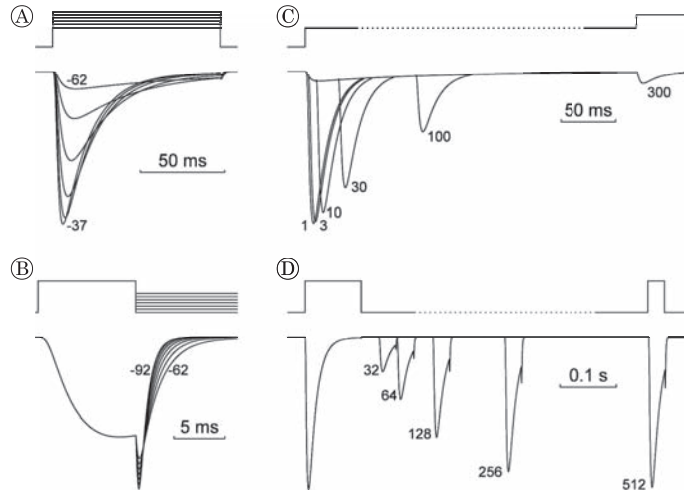
ここで  $v$  は  $V_m$ 、 $cai$ 、 $cao$  は各々  $[Ca^{2+}]_{in}$ 、 $[Ca^{2+}]_{out}$  を表す。

としておき、以下のような関数ブロック (場合分けにより 0mV 近傍での計算値を近似して与える) により、G-H-K 方程式の項を別途計算すればよい。

```
FUNCTION ghk(v(mV), ci(mM), co(mM)) (0.001 coul/cm3) {
LOCAL z
z = (0.001)*2*F*v/(R*(celsius+273.15))
ghk = (0.001)*2*F*(ci*efun(-z) - co*efun(z))
}
FUNCTION efun(z) {
if (fabs(z) < 1e-4) { efun = 1 - z/2 }
else{ efun = z/(exp(z) - 1) }
}
```

ここで celsius は摂氏温度、fabs() は絶対値を返す関数である。

実際のシミュレーション結果を次の図に示す。Ⓐは保持電位 -92mV から各電位レベル (-62mV から -37mV まで 5mV 刻み) へ 100msec の脱分極ステップを与えたときの電流応答であり、活性化及びそれに続く減衰の時間経過とそれらの膜電位依存性が観測される。Ⓑは保持電位 -92mV から -42mV へ 10msec だけ脱分極ステップを与え、その後各電位レベル (-92mV から -62mV まで 5mV 刻み) へ再分極した時の電流応答であり、脱活性化の時定数とその膜電位依存性が観測される。Ⓒは保持電位 -92mV から一旦 -62mV



へある時間長（1msec, 3msec, 10msec, 30msec, 100msec, 300msec）だけ脱分極ステップを与え、その後続いてさらに $-42\text{mV}$ へ脱分極ステップを与えたときの電流応答であり、この細胞の静止電位近傍における不活性化の進行過程（“entry into inactivation”）が観測される。①は保持電位 $-92\text{mV}$ から $-42\text{mV}$ へ100msecの脱分極ステップを与え、その後保持電位に各時間長（32msec, 64msec, 128msec, 256msec, 512msec）だけ再分極し、再び $-42\text{mV}$ へ脱分極を与えたときの電流応答であり、脱分極ステップにより不活性化したチャンネルが不活性化状態から回復する過程（“recovery from inactivation”）が観測される。

ここで使用したキネティックモデルは、H-Hモデルと比較しても推定するパラメータの数はほぼ変わらないが（e.g. Huguenard & McCormick 1992）、T型 $\text{Ca}^{2+}$ 電流の挙動において、その電流振幅、時間経過、膜電位依存性ともに、実験データを定量的に精度良く再現することができた。さらに、パラメータの推定に用いなかった実験データであっても、ほぼ精確に“予測”を行うことができた（Lee, Hayashida & Ishida 2003）。今回のシミュレーションでは、取り扱う時間長が比較的短いこともあり、Tチャンネルを介した $\text{Ca}^{2+}$ 流入による細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化の影響は、計算結果

にはほとんど現れなかった。細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度調節のモデリングについては、多くの論文・解説があるが、筆者らの論文も参考にして頂ければ幸いである（Hayashida & Yagi 2002）。

#### おわりに

本稿では、マルコフ状態遷移過程に基づくチャンネルのキネティックモデルについて、簡単な解説と実際の使用例を紹介した。キネティックモデルを用いたシミュレーションは、脱分極が繰り返し起こる際の累積的な不活性化を再現する上でH-Hモデルよりも正確に実験データを再現することができ（Serrano et al. 1999）、繰り返しシナプス入力による膜興奮性の順応やブライミング効果に関する定量解析を行う際に非常に有効であると考えられる（Lee, Hayashida & Ishida 2003）。また $\text{Na}^{+}$ チャンネルなど不活性化過程が細胞内伝達物質による調節を受ける場合にも、マルコフ遷移過程に基づくキネティックモデルは有用と思われる（Carr et al. 2003；Hayashida & Ishida 2003；2004）。ここで取り扱ったモデルに馴染みのない読者の方もおられたと想像するが、NEURONでは一見複雑に見えるキネティックの部分も非常に簡潔にプログラミングできるため、H-Hモデルベースからマルコフ状態遷移過程モデルへの移行も意外と簡単であることをお分かり頂けたのではない



かと期待している。

### 参考文献

- Armstrong CM & Bezanilla F : Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol* **70** : 567–590, 1977
- Bezanilla F & Armstrong CM : Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol* **70** : 549–566, 1977
- Carr DB, Day M, Cantrell AR, Held J, Scheuer T, Catterall WA & Surmeier DJ. Transmitter modulation of slow, activity-dependent alterations in sodium channel availability endows neurons with a novel form of cellular plasticity. *Neuron* **39** : 793–806, 2003
- Chanda B & Bezanilla F : Tracking voltage-dependent conformational changes in Skeletal muscle sodium channel during activation. *J Gen Physiol* **120** : 629–645, 2002
- Chandler WK & Meves H : Slow changes in membrane permeability and long-lasting action potentials in axons perfused with fluoride solutions. *J Physiol* **211** : 707–728, 1970
- Cribbs LL, Lee J-H, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M & Perez-Reyes E : Cloning and characterization of  $\alpha 1H$  from human heart, a member of the T-type  $Ca^{2+}$  channel gene family. *Circ Res* **83** : 103–109, 1998
- Destexhe A & Huguenard JR : Nonlinear thermodynamic models of voltage-dependent currents. *J Comput Neurosci* **9** : 259–270, 2000
- Ellerkmann RK, Riazanski V, Elger CE, Urban BW & Beck H : Slow recovery from inactivation regulates the availability of voltage-dependent  $Na^+$  channels in hippocampal granule cells, hilar neurons and basket cells. *J Physiol* **532** : 385–397, 2001
- Fox JM : Ultra-slow inactivation of the ionic currents through the membrane of myelinated nerve. *Biochim Biophys Acta* **426** : 232–244, 1976
- Frazier CJ, Serrano JR, George EG, Yu X, Viswanathan A, Perez-Reyes E & Jones SW : Gating kinetics of the  $\alpha 1I$  T-type calcium channel. *J Gen Physiol* **118** : 457–470, 2001
- Fukushima Y & Hagiwara S : Currents carried by monovalent cations through calcium channels in mouse neoplastic B lymphocytes. *J Physiol* **358** : 255–284, 1985
- Hayashida Y & Ishida AT : Dopaminergic modulation of spike-generation mechanism in retinal ganglion cells. *Soc Neurosci Abstr* **264**. 17, 2003
- Hayashida Y & Ishida AT : Dopamine receptor activation can reduce voltage-gated  $Na^+$  current by modulating both entry into and recovery from inactivation. *J Neurophysiol* **92** : 3134–3141, 2004
- Hayashida Y & Yagi T : On the interaction between voltage-gated conductances and  $Ca^{2+}$  regulation mechanisms in retinal horizontal cells. *J Neurophysiol* **87** : 172–182, 2002
- Huguenard JR & McCormick DA : Simulation of the currents involved in rhythmic oscillations in thalamic relay neurons. *J Neurophysiol* **68** : 1373–1383, 1992
- Jones SW : A plausible model. *J Gen Physiol* **114** : 271–275, 1999
- Kuo C-C & Bean BP :  $Na^+$  channels must deactivate to recover from inactivation. *Neuron* **12** : 819–829, 1994
- Kuo C-C & Yang S : Recovery from inactivation of T-type  $Ca^{2+}$  channels in rat thalamic neurons. *J Neurosci* **21** : 1884–1892, 2001
- Klemic KG, Shieh C-C, Kirsch GE & Jones SW : Inactivation of Kv2.1 potassium channels. *Biophys J* **74** : 1779–1789, 1998
- Lee J-H, Daud AN, Cribbs LL, Lacerda AE, Pereverzev A, Klöckner U, Schneider T & Perez-Reyes E : Cloning and expression of a novel member of the low-voltage-activated T-type calcium channel family. *J Neurosci* **19** : 1912–1921, 1999
- Lee SC, Hayashida Y & Ishida AT : Availability of low-threshold  $Ca^{2+}$  current in retinal ganglion cells. *J Neurophysiol* **90** : 3888–3901, 2003
- Lux HD, Carbone E & Zucker H :  $Na^+$  currents through low-voltage-activated  $Ca^{2+}$  channels of chick sensory neurons : block by external  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . *J Physiol* **430** : 159–188, 1990
- Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclay J, Williamson MP, Fox M, Rees M & Lee J-H : Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391** : 896–900, 1998
- Rudy B : Slow recovery of the inactivation of sodium conductance in *Myxicola* giant axons. *J Physiol* **249** : 22–24, 1975
- Serrano JR, Perez-Reyes E & Jones SW : State-dependent inactivation of the  $\alpha 1G$  T-type calcium channel. *J Gen Physiol* **114** : 185–201, 1999
- Toib A, Lyakhov V & Marom S : Interaction between duration of activity and time course of recovery from slow inactivation in mammalian brain  $Na^+$  channels. *J Neurosci* **18** : 1893–1903, 1998