

培養脳細胞の全膜電位固定法, 及び局所的膜電位固定法 によるグルタミン酸チャネル特性の解析

永岡 諭*・蛭名 良雄*・新貝 鉦蔵**・橋本 基*

Analyses of Glutamate Current Fluctuations and Glutamate Single Channel Currents of Cultured Brain Neurons

Satoshi NAGAOKA, Yoshio EBINA, Ryuzo SHINGAI and Hajime HASHIMOTO

Abstract

Glutamate is an excitatory neurotransmitter which activates glutamate ion channels located on the membrane of neurons. We have investigated kinetics of the ion channels activated by application of glutamate or its agonist N-methyl-D-aspartate (NMDA) in cultured rat brain neurons. Methods of recording from the neurons are the whole cell clamp to make clear characteristics of the glutamate channels in the whole cell by analyzing the membrane current fluctuation, and the patch clamp to record directly the gatings of one or a few channels and to study their statistical characteristics in detail. Power spectrum density (PWS) of current fluctuations is obtained by FFT. The mean open time and the mean conductance of the channels are estimated by fitting PWS to the theoretical PWS curve (Lorentzian) by computer calculations or eye inspection. PWS fits, in most cases, a sum of two Lorentzian functions for glutamate current, whereas that of NMDA current fits a single Lorentzian with few exceptions. The fluctuated currents are depressed by Mg ions in the saline in negative membrane potential region. Fluctuation analysis shows that the opening probability decreases by the presence of Mg ions. The histograms of the conductans and the open time of NMDA channel obtained from patch clamp data. The mean open time estimated from the FFT analysis is 6 msec, which is close to the value (9 msec) estimated from the assumption that the mean open time obtained from the patch clamp recording has an exponential distribution.

1. はじめに

近年, すぐれた情報処理装置としての脳の働きに対

する関心が高くなってきた。複雑な脳の処理機能解明へのアプローチ法として, それらを構成する個々の細胞の働きを調べる方法がある。本論文では, 記憶や情動行動 (emotional behavior) に関係しているといわれている辺縁系 (limbic system) の一部である海馬, 及び中隔部由来のラット培養脳細胞を対象とする。人間を含む動物の脳内情報伝達物質の1つとして知られ

*山口大学工学部電気工学科

**山口大学医学部薬理学教室

る、グルタミン酸 (Glu)¹⁾ 及び、その作用薬である N-methyl-D-aspartate (NMDA) を与えた時に流れる膜イオン電流を測定し、その電流揺ぎを解析することにより、細胞膜上のグルタミン酸イオンチャネルの特性を調べる。NMDA チャネルは、記憶と関連しているとの報告²⁾がある。

2章では、膜電流測定法を、我々が工夫した点などを含めて述べ、3章では、Fast Fourier Transformation (FFT) を用いた電流揺ぎ解析法を述べる。膜電流揺ぎは、膜上の多数の単一イオンチャネルが活性化されることに起因する。1個のチャネルを流れる電流は、局所的膜電位固定法 (パッチクランプ法) を用いて直接観測できる。4章では、パッチクランプ法を用いた単一 NMDA チャネル記録の予備的な結果について述べる。

2. 試料とデータ計測

2.1 試料

実験に用いた細胞は、培養した神経細胞^{3),4)}であり、ラット胎児の脳の海馬、中隔部より採取したものである。(これらの部位には、グルタミン酸が伝達物質として働いていると、言われている^{5),6)}。酵素(トリプシン)を用いて単離した細胞は、培養液(Eagle's MEM+5%牛胎児血清) 3 ml のはいたプラスチック皿にまき、炭酸ガス培養器(5%CO₂, 37°C)で、10~17日間培養する。培養液は、2日毎に新しい液と交換した。

2.2 全膜電位固定法による膜電流揺ぎ計測

Fig. 1 に実験に用いる装置システム図を示す。皿の中は、細胞外液⁴⁾(145mM NaCl, 6 mM KCl, 2.5mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 0.5mM NaH₂PO₄, 10mM glucose, 5 mM Heps(pH7.4))が常に流されている。全膜電位固定法⁷⁾(以下、ホールセル法と称す)では、一本の低抵抗の記録電極により、細胞全体の膜電位がフィードバック増幅器を用いて固定(以下、固定電位は hp と略記)されている。この電極は、先端が2~3ミクロンのガラス電極で、細胞内部と等張の溶液⁴⁾(150 mM CsCl, 5 mM EGTA, 10mM Heps (pH7.2))で満たされている。電位固定の状態、先端7~10ミクロン程度の別のガラスピペット(以下、DRP と略記)に満たされた薬物を、加圧力で記録中の細胞に与える。薬物で活性化されたチャネルを流れるイオン電流を、記録電極を通して計測し、増幅器を通し、データレコーダに記録する。記録されたデータは、必要に応じて再生し、解析に用いる。

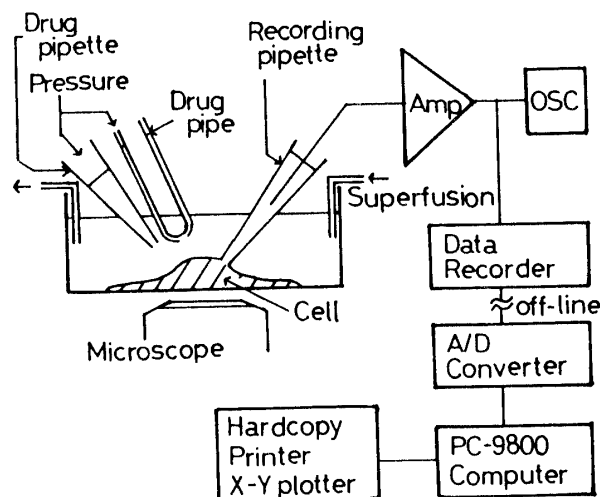


Fig. 1 The block diagram of experimental system.

DRP を用いた方法では、小さな細胞体にのみ薬物を与えることができるが、DRP を細胞に近づけるマニピュレータは、2個使用するのが限度である。実験では、種類や濃度の異なる薬物を1つの細胞に与えて反応を見るのが望ましいので、DRP の代わりに穴の開いたパイプを用いて、何種類の薬物を与える方法を行っている。この方法では、外径約0.8mmのパイプを曲げ、その先端部に穴(直径約40ミクロン)を開けてあり、薬物を加圧により細胞に与える。パイプの中を異なる薬物で満たしながら変えれば、幾種類もの薬物を与えることができる。現在5種類の薬物を与える事ができるが、DRP を用いる方法に比べて、一度に与える薬物の量が多すぎる場合がある事(パイプの穴が細胞と比較しても大きい)や、薬物が穴より漏れてしまうのではないかと問題もある。薬物の漏れを防ぐため、薬物を与えない間は、パイプ内を細胞外液で置換えている。

3. FFT による揺ぎ電流解析

3.1 パワースペクトルの計算

データレコーダに記録されたデータは、カットオフ周波数2又は5 KHzのローパスフィルタを通し、10ビットA-D変換器を介して、コンピュータに入力される。サンプリング周波数は、解析を必要とする周波数が1 KHzまでなので、2 KHzに決定した。A-D変換されたデータを基に、FFTを用いてパワースペクトル密度(以下、PWSと略記)を計算する。データは、A-D変換時に16384個(時間長にして約8秒)を入力し、

このデータを800個おきにずらしながら, 10組の8192個のデータ各々についてFFTを用いて, PWSを計算する. これらPWSを加算平均(10回)して最終的なPWSを求めた.

また, 変換の積分が有限区間で行われているため, データの初と終わりの一割に, 裾部を0とするcosine型の滑らかなデータウィンドを掛け, データが連続するようにした⁹⁾. 得られたPWSを見やすい形にするため, 更にハニングウィンドを掛けて, 平滑化を行った⁹⁾.

3.2 フィッティング法

細胞膜上には, 多数のグルタミン酸チャネルが存在し, 薬品の投与によりチャネルが活性化される. すなわち, 今まで閉じていたチャネルが平均開口時間 τ で, 開閉を繰り返すという単純なモデルが考えられている. 1種類のチャネルが時間 τ で, 開閉(チャネルのコンダクタンスは, 閉じている時に0, 開いているときに0でない有限の値をとる.)を繰り返すと, その電流揺ぎのPWSは, (1)式のようなローレンツ曲線で表わされる⁹⁾.

$$PWS(f) = \frac{2 \cdot \gamma \cdot \mu_1 \cdot (V - V_{eq}) / \alpha}{[1 + (2 \cdot \pi \cdot f / \alpha)^2]} \quad (1)$$

(PWS(f): 周波数 f の揺ぎのパワースペクトル密度, V : 固定電位 (hp), V_{eq} : 平衡電位, μ_1 : 平均電流)

また, α は平均開口時間 τ と(2)式の関係がある.

$$\alpha = 2 \cdot \pi \cdot f_c = 1 / \tau \quad (2)$$

(f_c : 特性周波数 (Cut off frequency))

よって, 計算されたPWSにローレンツ曲線をフィットさせ, その f_c より平均開口時間を, また, チャネルのコンダクタンスを(3)式より求める.

$$\gamma = \{PWS(f) / \alpha\} / \{2 \cdot \mu_1 \cdot (V - V_{eq})\} \quad (3)$$

フィッティングされた程度の評価は, AIC (Akaike's Information Criteria)¹⁰⁾及び, 視覚による判断で行う. 視覚による選択方法では, f_c , PWS(0)の異なるローレンツ曲線の鋳型を多数作り, PWSに重ね合わせて, 最もフィットする鋳型を選んだ. 1個のローレンツ曲線でフィットできる場合は, 人間の視覚による方法が, フィットの良さ, 関数を選ぶスピードの速さの点で最良であった. 2種以上のチャネルが存在する場合, 又は, 2個以上のコンダクタンスを持つチャネルが存在する場合は, 2本以上のローレンツ曲線の和で表せる¹¹⁾. このような場合, 鋳型が多くなりすぎて, 視覚によるフィッティングは不可能になり, 計算機を用いたAICによる判断が使われた.



Fig. 2 Membrane currents induced by application of 10 μ M glutamate to the same cell in Mg-free saline (Mg(-)) and in normal saline (Mg(+)). hp = -40 mV. The horizontal bar indicate the period (20 sec) of application of glutamate.

3.3 フィッティング解析による結果と説明

Fig. 2(a), (b)に, 細胞外液にMgイオン有(Mg(+)), 無(Mg(-))の2つの条件下で, グルタミン酸を与えた時のイオン電流を示す. 下向きの軌跡は, 細胞内への電流の増加を示す. Mgイオン有無によって, イオン電流が大きく異なる. Fig. 3(a), (b)に, Fig. 2のそれぞれのデータからPWSを求め, それに(1)式をフィッティングさせた結果を示す. 薬物を与えていない時の揺ぎのPWSは, 薬物を与えた時のPWSから, バックグラウンドノイズとして差し引いてある. 図中の点は, 実測値からのPWS, 実曲線は(1)式のローレンツ曲線を示す. f_c は, 特性周波数 (Cut off frequency)を示す.

グルタミン酸によって活性化されるチャネルは, Mgイオンにより抑制される事が知られている^{12), 13)}が, 2つのPWSを比べてみると, 明らかにMgイオン無しの状態(Mg(-))に対し, Mgイオン有りの状態(Mg(+))ではPWSの値が小さくなり, Mgイオンによる抑制効果が見られる. 2つのローレンツ曲線の f_c 値は, ほぼ等しい(28Hz), 従って, Fig. 2のMgイオンによる電流の減少は, チャネルのコンダクタンスは変わらなかったと仮定すると, チャネルの開口時間の減少ではなく, 開口頻度が減少したためと解釈される.

Fig. 4に, 別の実験でのグルタミン酸によるPWSの例を示す. この例では, 1つのローレンツ曲線でフィットさせることができず, 2本の和でフィットさせたものである. これは, 2種類のチャネル, 又は, 開口状態が2個の(チャネルが2つの有限なコンダクタンス値を持つ.)チャネル^{14), 15)}がグルタミン酸により, 活性

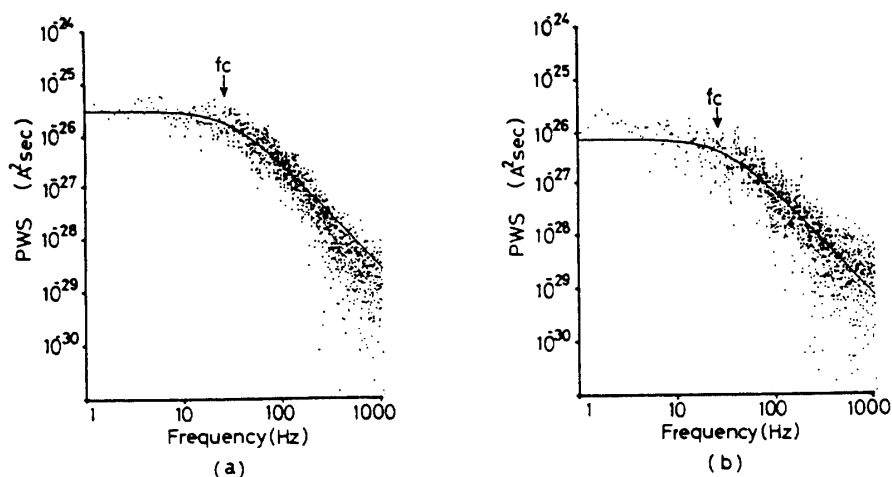


Fig. 3 Power spectrum density (PWS) of fluctuations of the same glutamate-currents as those in Fig.2. The solid curves are Lorentzian curves calculated from the equation (1) and fitted by eye inspection. Cut-off frequency $f_c = 28\text{Hz}$ in both curves.

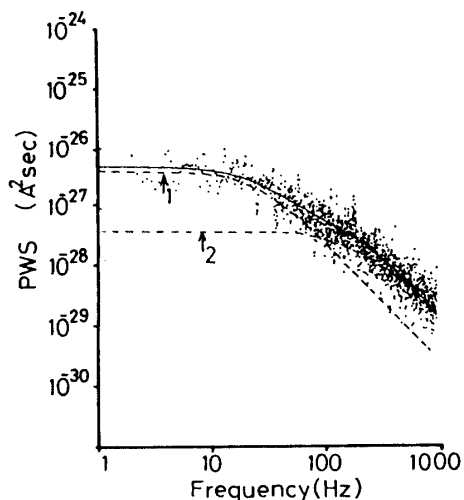


Fig. 4 PWS of fluctuation of glutamate-current in the case that PWS fits a sum of two Lorentzians (dotted curves 1 and 2). Cut-off frequencies are 26 Hz for (1) and 190 Hz for (2). $h_p = -60\text{mV}$.

化されていると思われる。

グルタメイトを与えた時は、2本の曲線の和でフィッティングできる場合が多く、NMDAを与えた時は、1本のローレンツ曲線でフィッティングできる場合(NMDAチャンネルのコンダクタンスは、ほぼ一種類であるため)がほとんどである。

4. 局所的膜電位固定法による膜電流計測

4.1 局所膜電流計測

2章で示したホールセル法は、パッチクランプ法¹⁴⁾と比較すると、まだ良く知られていない細胞系、又、チャンネルの特性を全体像を通して見る場合には適しているが、各チャンネル毎の平均閉口時間を知ることができない。すなわち、チャンネルの開閉状態が複数存在する場合、揺ぎのPWSとコンダクタンス、及び、平均閉口時間との対応関係を得ることが困難である。このため、1個又は、数個のチャンネルの特性を直接測定できるパッチクランプ法によるデータの測定を行っている。方法の詳細は、付録に記す。

パッチクランプ法は、ホールセル法に比べ、パッチクランプ状態にするまでが難しく、また、数pAの小さな電流を観測するために、より一層のノイズ対策が問題となってくる。ノイズ対策として、周波数の高い雑音を除くため、記録電極の皿内の液に浸る部分を、できるだけ先端に近い部分まで疎水性の絶縁物を塗りつけている。また、記録されたデータ中に含まれる60Hz電源ノイズをコンピュータ・プログラム処理で除いている。

我々が行っている outside-out パッチクランプでは、細胞膜外面が記録電極の外部に向いているため、通常の細胞の状態と同様に、細胞膜外部より容易に、異なる種類の薬物を与えたり、細胞膜を洗浄できる。

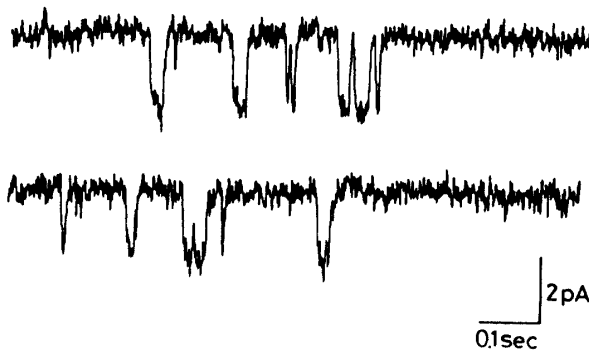


Fig. 5 Single channel current induced by $10 \mu\text{M}$ NMDA under the patch clamp recording. $h_p = -60\text{mV}$.

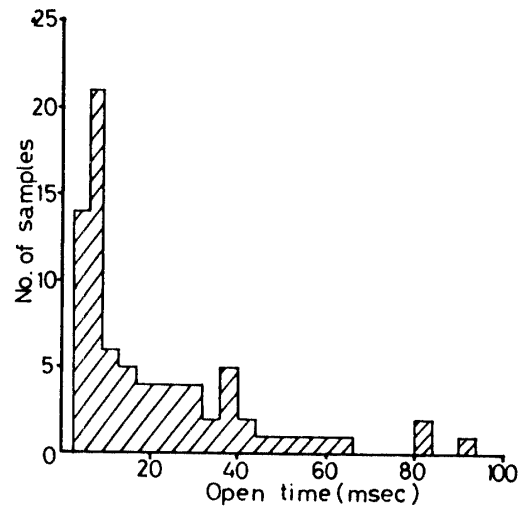


Fig. 7 Histogram of the open time for the same channel as Fig. 5

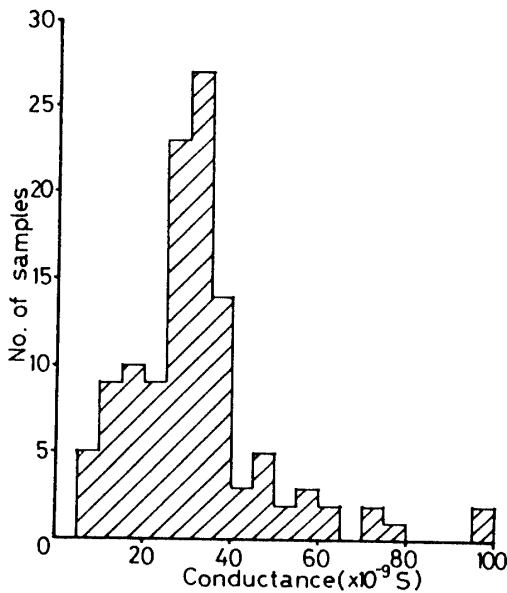


Fig. 6 Histogram of the conductance of the open channel. Data were collected from Fig. 5.

4.2 測定結果と説明

Fig. 5 に outside-out パッチクランプ法より得られた局所膜電流の時系列データを示す。瞬時に下向きの電流が流れるのは、1つのチャンネルが閉じた状態 (コンダクタンス 0) から、瞬時に有限のコンダクタンス値を持つ開いた状態に移るためだと思われる⁷⁾。この曲線の縦軸の大きさよりチャンネルのコンダクタンス、横軸の値より開口時間が直接測定できる。測定は、時系列データをプリンタに打ち出して行った。

Fig. 6 にデータより得られたコンダクタンスのヒストグラムを示す。この図より、 $10 \mu\text{M}$ の NMDA によって活性化されるチャンネルは、そのコンダクタンスが約

30pS 前後のもので、1種類のチャンネルと思われる。

Fig. 7 に、開口時間のヒストグラムを示す。この図が指数分布していると仮定し、縦軸 (データ数) を log スケールにとると、直線で近似できるグラフとなる。この直線の傾きの逆数が平均開口時間となり、ポアソン分布曲線とのフィッティング計算から 9 msec となる。

5. まとめと考察

グルタミン酸によって活性化されるチャンネルの特性を調べるために、培養された脳細胞を用い、ホールセル法で測定したイオン電流揺ぎを解析し、また、パッチクランプ法を使用して、単一チャンネルの解析を行って次の結果を得た。

- (1) グルタミン酸チャンネルは、Mg イオンにより、その活動が抑制されていることが知られているが、我々の用いた培養脳細胞においても、Mg イオンによる開口頻度の減少が見られる。
- (2) グルタミン酸を細胞に与えた時、電流揺ぎ解析により、グルタミン酸によって活性化されるチャンネルは、2種又は、2個の開口状態を持つチャンネルと予想される。
- (3) パッチクランプ法より得られたデータより、 $10 \mu\text{M}$ の NMDA により活性化されるチャンネルは、統計的処理により、コンダクタンスが 30pS、平均開口時間が 9 msec であった。

但し、パッチクランプ法による記録は、まだ得られた記録数が少なく、これを増やし、統計的信頼度を高める必要がある。電流揺ぎ解析の結果と、パッチクランプ

ンプ法による結果を常に比較, 検討することは, 個々のチャンネルの振舞で, 細胞全体のチャンネルのそれを説明できるかどうかを知る上で重要である。

NMDA のパッチクランプによる結果を, ホールセル法で得た NMDA 電流揺ぎの解析の結果と比較すると, コンダクタンス, 平均開口時間共に, ほぼ一致している。

処理法に関する今後の課題として, パッチクランプ法より得られたデータのヒストグラム等, 作成のための統計的処理プログラムを作成する必要がある。これらの計算機処理により, 単一チャンネル記録において異なるコンダクタンスが測定された場合, それが異なる複数のチャンネルによるものなのか, 又は, 1 種のチャンネルが異なる開口状態を持つ事を示すのかがわかる。また, チャンネルの状態遷移を, コンピュータシミュレーションなどによって, 検討することも必要となろう。

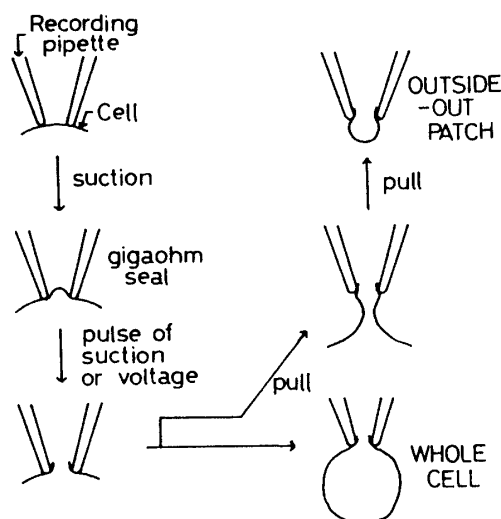


Fig. 8 Schematic representation of recording configurations. The upper left frame is the configuration of a mechanical contact with a cell. Upon slight suction the resistance of seal between electrode pipette and membrane increases to more than one giga-ohm. Further suction or application of electric pulses disrupts the patch membrane to allow recording of voltage clamp current if cells of sufficiently small diameter are used (the whole cell clamp). Alternatively, withdrawal of the pipette from the cell (pull) leads to the outside-out patch configuration.

付録・パッチクランプ法⁷⁾

パッチクランプ法を Fig. 8 を用いて説明する。(a)液で満たされた電極を細胞に接触させる。(すべては, 倒立顕微鏡下で行われる。)(b)この状態で, 電極中の液を外部より吸引することにより, 電極先端部と細胞膜の間に数 $G \Omega$ のシールをつくる。シール形成は, アンプから $10mV$ 程度のパルスを与え, 流れるリーク電流の大きさから確認されるが, 電極先端部に汚れがあると, 低い数値のシールとなってしまふ。次に, (c)吸引又は, 電圧 ($100 \sim 200mV$ 程度) のパルスを与え, 電極先端内にある細胞膜を破る。この時までには, 吸収は止めてあるが, 電極内と細胞内が通じたために, 電極を通じて, 専用アンプで細胞全体の膜電位を固定でき, 細胞膜上にあるチャンネルを通るイオン電流が観測できる (ホールセルクランプ法)。

(d) ホールセルクランプの状態において, 電極を細胞より, じだいに遠ざけると, 細胞膜が引きのばされ, 膜内が接着し, 細胞よりちぎれる。こうして, 電極の先端に, 細胞の外部にあった膜の面が, 電極の外部になる様になる。これが outside-out patch である。この他, 細胞の内側にあった膜の面が, 電極の外部になる様な inside-out patch があるが, 我々の実験では, 用いていない。

参考文献

- 1) J. C. Watkins and R. H. Evans: Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 21 (1981) 165-204.
- 2) R. G. Morris, E. Anderson, G. S. Lynch and M. Baudry: Nature 319 (1986) 774-776.
- 3) Marc A. Dichter: Brain Research, 149 (1978) 279-293.
- 4) R. Shingai and Y. Ebina: Brain Research, 448 (1988) 198-203.
- 5) M. Joels and I. J. A. Urban: Exp. Neurol., 84 (1984) 126-139.
- 6) M. Joels and I. J. A. Urban: Exp. Brain Res., 54 (1984) 455-462.
- 7) O. P. Hamil, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth: Pflugers Arch. 391 (1981) 85-100.
- 8) 日野幹雄, スペクトル解析, 朝倉書店 (1977) pp. 173と200-201.
- 9) C. R. Anderson and C. F. Stevens: J. Physiol. (Lond.), 235 (1973) 655-691.
- 10) H. Akaike: IEEE Trans. Autom. Control, AC 19 (1974) 716-723.

- 11) D. Colquhoun and A. G. Hawkes: Proc. R. Soc. Lond. Ser. B., 199 (1977) 231-262.
- 12) M. L. Mayer, G. L. Westbrook, and P. B. Guthrie: Nature (Lond.), 309 (1984) 261-263.
- 13) L. Nowak, P. Bregestovsky, P. Ascher, A. herbet and A. Prochiantz: Nature(Lond.), 307 (1984) 462-465.
- 14) S. G. Cull-Candy and M. M. Usowicz: Nature (Lond.), 325 (1987) 525-528.
- 15) C. E. Jahr and C. F. Stevens: Nature (Lond.), 325 (1987) 522-525.

(昭和63年4月15日受理)