

パッチクランプ法による細胞膜電流の測定

1. 電気回路

電荷、電圧（電位）、電流とその単位

物質の持つ"電気の量"のことを電荷という。電荷を持つ物質そのもののことを電荷ということもある。電荷を持つ他の物質と引き合う（反発しあう）力はそれぞれの電荷の量の積に比例する。すべての電荷量は素電荷（電子のもつ電荷 = 1.6×10^{-19} Coulomb）の整数倍である。単位時間あたりの電荷の動き（流れ）が電流であり、単位は Ampere(=Coulomb/s)である。2つの電荷間に働く力を記述することは容易だが、多くの電荷が存在する空間において、しかもその電荷の分布が時間により変化するような空間において、ある電荷に働く力を記述することは容易ではない。このため、ある電荷に働く電氣的な力が存在するとき、その電荷は電場の中に存在するといいい、単位電荷あたりに働く力を持って電場の大きさと定義する。電場にさからって電荷をある距離だけ移動させると、電荷は受けた仕事の分だけ潜在エネルギー（ポテンシャル）が増加する。物を重力にさからって高い山の上に運ぶと、位置エネルギー（ポテンシャル）が増加するのと同様である。単位電荷あたりのこの潜在エネルギー（ポテンシャル）を電位と呼ぶ。山の上の物が低地に落下すると位置エネルギーは運動エネルギーに変換されるように、電位勾配のあるところを電荷が通過すると、電荷は電場により力を加えられ、運動エネルギーに変換される。電位勾配の大きいところがすなわち電場の強いところになる。2点間の電位の差を電位差と呼ぶ。電位(及び電位差)の単位は Volt (=Joule/Coulomb)である。電位は相対的なもので 0 V は任意に決定出来るが、通常はアースのある部位を 0 V とする。パッチクランプ法では、バスの溶液（細胞外溶液）の電位を 0 とする。

抵抗、容量、コンダクタンス

ある電位差 V の存在する場所の間を I という大きさの電流が流れる時、その2点間には $R = V/I$ の抵抗がある、と定義する。抵抗値の逆数をコンダクタンスとよぶ。1 Volt の間を 1 A の電流が流れるとき 1 Ω の抵抗がある、または、1 S (Siemens)

のコンダクタンスであるという。抵抗が直列に接続されるとき、全抵抗値は各抵抗値の和であり、抵抗が並列に接続されるとき、全コンダクタンスは各コンダクタンスの和になる。イオンチャンネル1つは、非常に小さいコンダクタンスを有している。しかし、膜の上には通常 1000-100000 個程度の同種のチャンネルが存在するので、そのコンダクタンスの合計は大きいものとなる。ある γ pS のコンダクタンスを有するイオンチャンネルが膜上に N 個(並列に)存在するとき、膜のそのイオンチャンネルによるコンダクタンスは γN pS となる。チャンネルの電流の通しやすさ(にくさ)を表す際は抵抗値よりコンダクタンスを用いたほうが計算しやすいことが多い。シングルチャンネルのコンダクタンスの値はそのチャンネルの重要な性質の1つである。

2つの電位の異なる導体に対立して存在していると、その間に電荷が蓄えられる。とりわけその2つの導体の間だけに電場が存在している場合、2つの導体に向き合って蓄えられる電荷の量 Q は、2つの導体の電位差 V に比例することになる。このようなときにこの2つの導体の組みのことをコンデンサまたはキャパシタと呼ぶ。 $Q = CV$ で表される C のことをこのコンデンサの容量、またはキャパシタンスという。1 V (Volt) の電位差のあるときに 1 C (Coulomb) の電荷を蓄えることのできる容量のことを、1 F (Farad) という。

オームの法則

電流の抵抗値は、実際温度などの条件が変化しなければ電位差に係らずほぼ直線的に変化する。このことをオームの法則と呼ぶ。オームの法則と抵抗値の定義はよく似ているが、オームの法則は(実用上)どの温度で測定しても、またどのような大きな電圧(電位差)をかけても、その抵抗値は変わらない時に成立する。パッチクランプで扱うような単位ではおおむねこのことは正しい。

コンデンサーの充電・放電

コンデンサーは定常状態では直流電流は流さないが、電池につなぐことにより電荷が貯えられるまでの間、一過性に電流が流れる。電池が切れて、両端から電圧差が突然消失したときには、放電が起こるが、このときに流れる電流についても同様のことがいえる。回路に抵抗がなければ瞬時にコンデンサーに $Q = CV$ で表されるような電荷が貯えられるが、 R という抵抗があると図 1 に示すような時間過程で電荷が貯えられる。 RC をこの回路の時定数とよぶ。

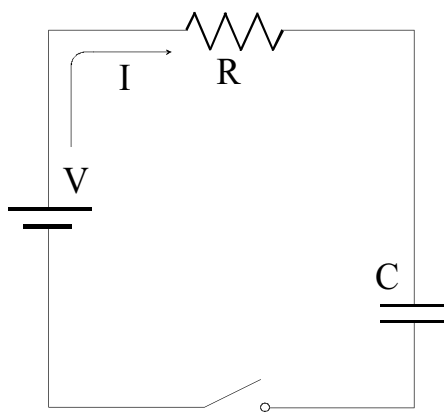


図 1 抵抗と容量を含む回路

$$I = \frac{dQ}{dt} \dots\dots\dots(1)$$

$$IR + \frac{Q}{C} = V(\text{一定}) \dots\dots(2)$$

(2)の両辺を t で微分し、
(1)を代入すると

$$I = -RC \frac{dI}{dt}$$

$$\therefore I = I_0 e^{-\frac{t}{RC}} \quad \text{但し } I_0 = R/V$$

2 . 膜電位とイオン電流

電気化学ポテンシャルとNernstの式

物質の移動する方向や、化学反応の向きは化学ポテンシャルによって決まる。理想溶液（溶質 A）の化学ポテンシャル（Gibbs の自由エネルギー）は、A の濃度の関数であり、

$$\mu = \mu^0 + RT \cdot \ln[A]$$

と表される。ここで、 μ_0 はその溶液中での A の標準化学ポテンシャル、 R はガス定数、 T は絶対温度である。特にイオン溶液などを考えるときには、イオンの周囲の電場（電位差のある状態）を考慮しなければならない。電位 ϕ の電場に存在する溶質イオン A^{z+} の電気化学ポテンシャルは、

$$\mu = \mu^0 + RT \cdot \ln[A^{z+}] + zF\phi$$

と表される。ここで、F はファラデー定数 (1 当量 (電子 1 モル) の電荷量 : 96500 Coulomb) 、z はイオンの荷電数を表す。

細胞膜を挟むイオンの動きを調べてみよう。通常細胞膜はイオンと透過させないが、イオンチャネルが開いた時、果たしてある陽イオン A^{z+} は膜の内から外に移動するであろうか、それとも逆であろうか？ 平衡状態では細胞内外は陽イオン A^{z+} の電気化学ポテンシャルは等しいので、

$$RT \cdot \ln[A^{z+}]_i + zF\phi_i = RT \cdot \ln[A^{z+}]_o + zF\phi_o$$

$$\begin{aligned} \therefore E_{rev} = \phi_i - \phi_o &= \frac{RT}{zF} \ln \frac{[A^{z+}]_o}{[A^{z+}]_i} \\ &= \frac{58.2}{z} \times \log_{10} \frac{[A^{z+}]_o}{[A^{z+}]_i} \quad (\text{at } 20^\circ\text{C}) \end{aligned}$$

と表される。この式を Nernst の式と呼び、この E の値のことをイオン A^{z+} の平衡電位と呼び、膜の両側の濃度によってのみ決まる値である。膜の細胞の膜電位について論じるときは、常に外側の電位を 0 として表す約束となっているため、 $\phi_o=0$ である。イオン A^{z+} のみを通すイオンチャネルでは、 E_{rev} よりも正 (浅い) の膜電位では、陽イオン A^{z+} の電気化学ポテンシャルは、内のそれに比べ外の方が小さくなるので、イオン電流は外向きに流れようとし、逆に E_{rev} よりも負であれば内向きに流れることになる。ある膜電位 E のときに A^{z+} のみを通すイオンチャネルを流れる電流 I は、

$$I = g(E - E_{rev})$$

と書け、電流の大きさはイオンチャネル特有の (チャネルのゲーティングに依存する) 値である g と膜電位と平衡電位の差に依存する。実際のチャネルでは g は E の関数であることが多い。後述するように、この式から、チャネルがどのような g の値を持っていようとも、 $E=E_{rev}$ の膜電位においては必ず電流は 0 であることに注意したい。この性質は、イオンチャネルがどのイオンを透過させるかを調べるときに利用される。

イオンの透過性と選択性

イオンチャネルのあるものは、非常に選択的であり、多くの K チャネルはほと

んどといっていいほど Na を透過させない。しかしながら、多くのイオンを透過させるイオンチャンネルも多数存在する。このようなイオンチャンネルにおいて、上記のような電流を流さない E (逆転電位) はどのようにして決められるのであろうか？また、膜上には様々な種類のイオンチャンネルが存在する。それらのチャンネルを流れる総和が 0 になる時、すなわち細胞内外で見かけ上電流が流れていないように見える電位 E' はどうであろうか。E と E' は同じ値になることは明らかであり、直感的に複数のイオンに関する電流について加味したような値になることが予想出来るであろう。Goldman, Hodgkin, Katz は、電位差 V のあるときに 1 つのイオン A^{z+} によって担われる電流は

$$I = P_A z^2 \frac{VF^2}{RT} \frac{[A^{z+}]_i - [A^{z+}]_o \exp(-zFV/RT)}{1 - \exp(-zFV/RT)}$$

であることを示した (Goldman-Hodgkin-Katz (GHK) 電流方程式)。ここで P_A は透過係数であり、上記の式からその絶対値を求めることもできる。あるイオンチャンネルを通すすべてのイオン A, B, C によって担われる電流の総和が 0 になるときの V が逆転電位である。イオンがすべて一価であるとき、

$$E_{rev} = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_A[A]_o + P_B[B]_o + P_C[C]_o + \dots}{P_A[A]_i + P_B[B]_i + P_C[C]_i + \dots}$$

と表される。この式を GHK 電圧方程式という。この式から逆にイオンチャンネルのイオンごとの透過性を求めることができる。イオンの透過性は、イオンチャンネルのもっとも重要な性質の内の 1 つであり、チャンネルのポア部分の性質を端的に表すものである。

静止膜電位と活動電位

GHK の式は、1 つのイオンチャンネルにのみ適応されるのみならず、多くのイオンチャンネル (やトランスポーター) による電流の総和が定常状態にある場合にも用いることができる。また、Na チャンネルのコンダクタンスの上昇による Na イオンの流入が膜電位の上昇を起こすことや、その後の Na チャンネルの不活性化及び K チャンネルのコンダクタンスの上昇に伴う再分極などの、膜電位の変化もこの式により定量的に理解出来る。

3 . 膜電流の測定

電気生理の初期の段階からガラス電極を細胞内に刺入し、細胞の膜電位を測定することが行われてきた。細胞の内側が（外に比べて）負の電位を有するという発見そのものが電気生理の始めであったともいえる。やがて、細胞が活動するときに、その細胞内電位（膜電位）が変化することが知られるにおよんで、その電位を正確に測定することの重要性が明らかになってきた。

いかなる測定も測定そのものに干渉されることなく行うことはできない。細胞内の電位を正確に測定しようとする、細胞内と接続された測定機器に細胞内から電流が流入する（または流出する）。このことが測定しようとする細胞内の電位を変化させてしまうことになる。やがて、（ピペットや細胞の抵抗に比べ）無限大の抵抗をもつ Voltage-follower を用いることにより、ピペット電極の電圧を測定器そのものに干渉されることなく、すなわち、細胞への流入電流を防ぎながら、正確な電位を測定することができるようになった。この方法は活動電位やその伝搬に関する多くの情報を得ることに非常に役立った。

やがて、生物学的な興味は、電位の変化を引き起こす原因に移った。いうまでもなく、膜電位の変化を起こすためには細胞膜をまたがる電流がなければならない。その電流を規定する要素は膜のコンダクタンスである。ある時に電流が大きくなるためには、ある時に膜のコンダクタンスが大きくならなければならない。この測定のためには、膜電位を人工的に固定した状態で電流を測定しなければならない。この方法を電圧固定法と呼ぶ。Hodgkin、Huxley らによる電圧固定法はイオンチャネルの存在を予見し、電気生理学のその後の大きな発展の礎を築いたのである。

チャネルの性質を測定するという事は、チャネルの電流の通しやすさ（コンダクタンス）がいろいろな膜電位や時間経過に従ってどのように変化するかということ調べることに他ならない。パッチクランプ法でも、チャネルの性質を明らかにするために、電圧固定法が主流であることに変わりはない。

電圧固定法による膜電流の測定

電圧固定法で最初に考えられたのが、一本の電極による電圧固定法である。こ

の方法は一本のピペットを介して電圧を測定しながら、かつ電圧値を一定にするためにフィードバックをかけるものである。しかし、細胞内刺入電極の抵抗が大きいため、実際に電圧固定をするのは容易ではなかった。

パッチクランプ法が開発されるまで電圧固定法に用いられていたもっとも一般的な方法は「2本刺し電圧固定法」とよばれる方法である。実際に、この方法を用いて電気生理学の研究は大きく進んだ。この方法では、一本の電極で細胞内電位を測定し、もう一本の電極でその電圧を一定にするために電流を注入、または流出させる。注入（または流出）した電流の大きさそのものが、イオンチャネルなど膜を通して流れた電流の大きさにほぼ等しくなるが、膜から流出した電流を膜のすぐ外側に電極を用意して測定する。カエル卵母細胞の電圧固定法に用いられているのもこの方法である。

やがて、パッチクランプ法が開発されるにともなって、微小なパッチ膜の電圧固定ができるようになったためシングルチャネル記録が可能となった。しかし、パッチクランプ法においてチャネルの研究を行う際にも、電圧固定法が主に使用されている。

パッチクランプ法の特徴

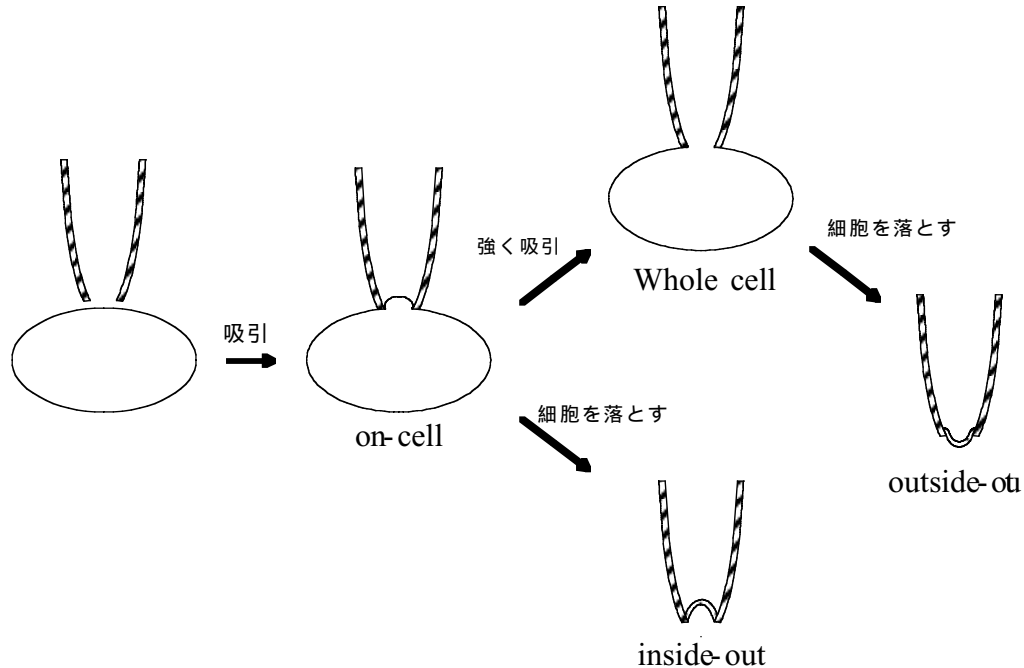
パッチクランプ法の要点は、ピペットを細胞内に刺入するのではなく、細胞膜を吸引してガラスピペットと細胞膜を非常に密に接着させた点にある。このことにより、漏れ電流が非常に小さくなり ($>1 \text{ G}\Omega$)、それに伴い小さな信号電流、とくに、シングルチャネル記録が可能になった。また、同時に漏れ電流が減ったことで、ノイズが減少し S/N 比の大きな（良好な）記録が得られるようになった。

これまでの方法と大きく異なるのは、刺入するのではなく、細胞膜を引き寄せさせるために、これまでと比べ口径の大きいずんぐりとした形のピペットを使用することである。このため、ピペット抵抗が大幅に減少し、微少な電流ならば、ピペット抵抗（直列抵抗）による電圧降下の影響を無視して（完全に無視してはいけない）測定しうるし、電圧固定が速やかにできるようになった。従って、2段のオペアンプを用いたパッチクランプアンプを使用して、一本の電極で電圧固定と電流測定が可能になったのである。

さらに、電極2本差しによる電圧固定法では、刺入電極を（しかも2本）用いるため、どうして漏れ電流が大きくならざるをえなかった。特に、比較的小さな細胞をこの方法で電圧固定するのは至難である。パッチクランプ法ではわずか一本の電極を細胞に吸い付けるだけで良いので、手技が簡便であることも大きなメリットである。

パッチクランプ法で用いられる主なコンフィギュレーションを図2に示す。

図4 主なパッチクランプコンフィギュレーション



on-cell、inside-out、outside-out のパッチ膜を電圧固定する方法は主としてシングルチャンネル記録を、ホールセル（全細胞）法は細胞全体のマクロ電流を得るのに用いる。本来パッチというのは細胞膜片を表す言葉であるので、ホールセル法はパッチクランプとは言い難いが、もっともよく用いられるコンフィギュレーションとして、パッチクランプ法に含めるのが普通である。

図2を見ればわかるように、もともとの細胞内がピペット内を向くのか、バス側を向くのがわかるであろう。ピペット内溶液を灌流することも技術的には可能であるが、一般的にはバス溶液を灌流する方がはるかに容易である。従って、実験の目的に応じてこれらのコンフィギュレーションを選択することになる。

ギガオームシール

パッチクランプ法では何よりも最初に数ギガオーム以上のシール抵抗を得ることが重要である。実際の方法は実習中にみて頂くが、良い実験を行うコツはできる限り大きなシール抵抗を得ることにつける。細胞により、細胞膜に軽くふれただけで吸引したほうが良いときと、かなり押しつけてから吸引をかけた方がよいときがある。

パッチクランプの実際の手順

パッチクランプアンプは1本の電極で、電圧固定とその時に流れる電流の測定を同時に行うことができる。シールを完成させるまで(またはホールセル型を得るまで)数ミリ秒の間隔でパルスを与えることは、すなわち、その時間ごとに電圧がかかるようにスイッチを入り切りするのと同じことである。ピペット電極をバスの溶液につけた状態では、回路にはピペットの抵抗のみが存在する状態に(ほぼ)等しく、

この状態で既知の電圧をかけて流れる電流を読むことにより、ピペットの抵抗を測定することができる。またピペット内の溶液とバス溶液の間や、バス溶液とアース電極との間にできるジャンクション(接続)電位をキャンセルしておくことを忘れてはならない。

ピペットを細胞に近づけると、次第に電流が小さくなり、細胞膜が完全にピペットに密着した状態となると、ピペット電極とアース電極の間の抵抗は数 $G\Omega$ 以上に達する。これが、ギガオームシールである(。このときに流れる電流は非常に小さいため、ピペッ

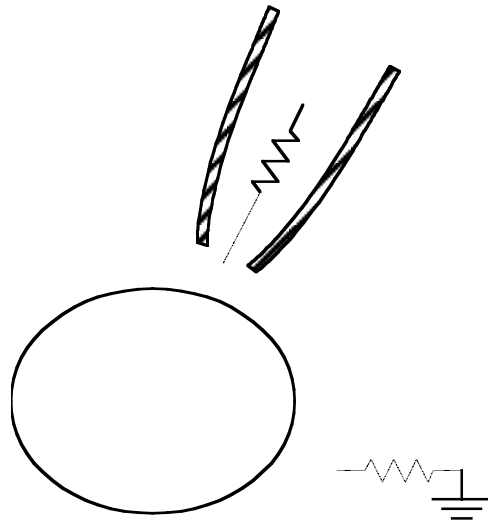


図7 ピペットをバス溶液に浸したところ

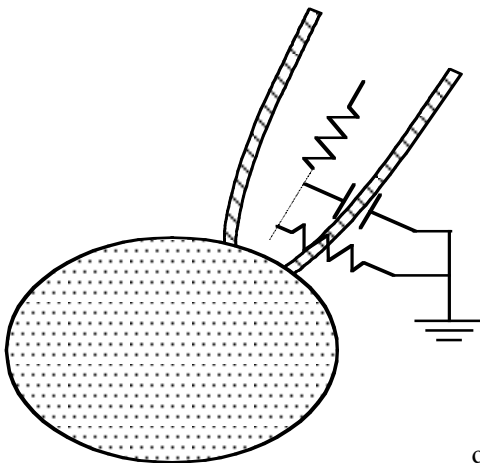


図8 ギガオームシール形成

トのガラスの内外に構成されるコンデンサー（キャパシター）を通り流れる（もちろん一過性の）電流を無視することができなくなるため、アンプ上での補正が必要となる。この状態で、シングルチャンネルを観察することができる（図4）

全細胞記録法

さらにこの cell-attached の状態から、ピペット内をさらに吸引するとパッチ膜が破れ、図5に示すような等価回路が完成する。リーク電流を除いた膜電流こそが観察すべき全細胞膜のチャンネル（あるいはトランスポーター・ポンプ）を通過する電流である。ホールセル法では回路中に細胞膜全体の容量を考慮しなければならない。すなわち固定する電圧を変化させると一過性に大きな容量電流が回路に流れるため、速い時間経過をもつ電圧依存性の電流を観察する際はこの補正をすることが必要である。

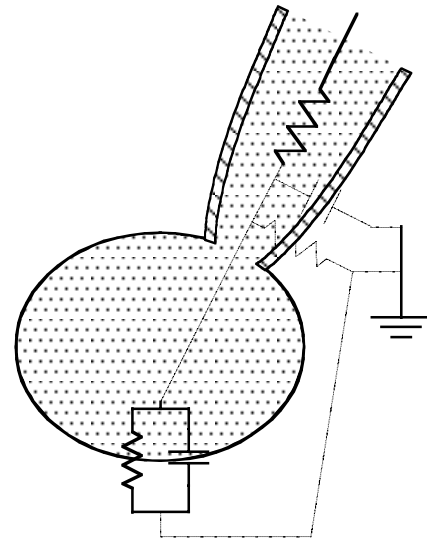


図9 ホールセル（全細胞）モード

4. 解析

実験によって得られたデータは解析しなければならない。様々な実験の目的が存在するであろうが、電気生理学として重要なことは、観察される現象がどのチャンネル電流に依存したものを明らかにすることである。チャンネル電流の同定および記述に関して重要なのは、大きく分けて次のように分類することができる。

1. チャンネルのイオンに対する透過性

多くのイオンチャンネルは何らかのイオン選択性を有している。事実上1種類のイオンしか透過させないものもあれば、多くのカチオンまたはアニオンを透過性の大きい、小さいはあっても通すものもある。イオンがチャンネルを透過していく

ときは、トンネル中を車が走っていくようなイメージでは、とらえられないことがおおい。むしろ、宇宙基地間をワープする宇宙船のイメージの方が良いかもしれない。同一種のイオンが透過するときと、いくつかの異なったイオンが存在し同時に透過するときでは、相当イオンチャネルの透過様式に違いがみられることには、注意をしなければならない。

2. チャネルの開閉（ゲーティング）にかんするパラメータ

電圧作動性、リガンド作動性、機械刺激作動性などがチャネルの開閉を司る主な因子である。シングルチャネルのコンダクタンスを γ とする。これは膜電位の関数であったり、時間の関数であったり、またリガンドの濃度依存性であったりする。シングルチャネル電流（の大きさ）(single channel amplitude)は、 $i = \gamma(E - E_{rev})$ とかける。 E_{rev} はそのチャネルの逆転電位である。特に一種類のイオンしか透過しないときは、これはそのイオンの平衡電位に等しい。 $E - E_{rev}$ を駆動電圧という。

whole-cell モードで観察できる電流はこのシングルチャネル電流に、チャネルの総数（発現していて、かつ開く可能性のあるチャネルの総数） N と開確率 P_o をかけたものになるので、

$$I = N P_o (E - E_{rev}) \gamma$$

と書ける。このうち、チャネルの開閉（ゲーティング）に関係するパラメータは P_o および γ であり、つまるところ、チャネルのゲーティングを記述するとは、この2つのパラメータの値もしくは関数式を求めることに他ならない。

電圧 - 電流(I-V)曲線

電圧固定された膜電位 E (V と記述されることも多い) と、そのときに流れる電流の関係をプロットすることにより、 $N P_o \gamma$ がわかる。とくに、(N は定数なので、) $P_o \gamma$ の電位依存性が明らかになる。電圧作動性チャネルほどはっきりしていなくとも、多くのチャネルの開確率は電位依存性である。

5 . 実習内容

用いる細胞

用いる細胞はヒト腎細胞由来細胞株 HEK293 細胞にイオンチャネル型受容体であるカプサイシン受容体 VR1 を強制発現させたものである。

トウガラシの主成分カプサイシンの受容体 VR1 はイオンチャネル型の受容体で、生体で痛みを惹起することが知られているカプサイシン、酸（プロトン）、熱刺激によって活性化する。この受容体は感覚神経に発現していて、痛み刺激によって活性化して陽イオンが細胞内へ流入して細胞が脱分極することから神経細胞興奮へつながると考えられている。

細胞外液：

組成：

Ca (-) Bath solution

	M.W.	(mM)
NaCl	58.44	140
KCl	74.55	5
MgCl ₂ 6H ₂ O	203.3	2
HEPES	238.31	10
Glucose	180.16	10
EGTA	380.35	5

pH 7.4 by NaOH

Ca (+) Bath solution では、EGTA を除いて CaCl₂ を 2 mM 加える。
酸性溶液 (pH 4.0) では、pH Buffer として MES を用いる。

細胞内液：

	M.W.	(mM)
KCl	74.55	140
HEPES	238.31	10
EGTA	380.35	5

pH 7.40 by KOH

吸引システム

注射器を用いて手で引いたり、水柱を利用してどのぐらいの強さの吸引がかかるかを見ながら吸引したり、口で吸引したり、といろいろな場合がある。実習では、注射器を用いて行う。

電極

メッキした塩化銀電極（Ag 電極を AgCl-Ag 電極とする。）を用いる。ガラス電極は、Sutter 社のプレーで作成する。パッチクランプ用のピペット作成には多段階引きが必要である。ガラス電極先端をスムーズにする（fire polish）。

ピペット溶液の充填

ピペット溶液は 0.20 μm のシリンジフィルターを用いて、ゴミをのぞいてからピペットに充填する。気泡を入れないように注意をする。後部より液を充填する前に、先端にわずかに溶液を毛細管現象を利用して（または積極的に吸引して）充填するのがコツである。

Whole-Cellモードで電流を記録する。

電圧固定法で、非選択的陽イオン電流を観察する。VR1 が発現している細胞を蛍光顕微鏡下の GFP (Green Fluorescent Protein) のシグナルをもとに選択する。

細胞外 Ca(-)条件で

- 1) -60 mV に電圧固定して、カプサイシン (10 nM, 100 nM, 1 μ M)投与による内向き電流を観察する。
- 2) 同様にプロトン (pH 4.0)による内向き電流を観察する。
- 3) -20 mV と $+20$ mV で電流の流れる方向が異なることを観察する。電流の大きさも異なることに注目。
- 4) 活性化された電流に対して、 -100 mV から $+40$ mV までの 20 mV 刻みのステップパルス(400 msec)を与えて、時間非依存性の電流応答を観察する。
電流電圧関係をグラフ化する。
- 5) 活性化された電流に対して、 -100 mV から $+40$ mV へのランプパルスを与えて、電流電圧関係を観察する。

細胞外 Ca(+)条件で

- 1) -60 mV に電圧固定して、カプサイシン (1 μ M)の繰り返し投与による内向き電流の減少 (脱感作) を観察する。

(参考文献)

- 1) B. Hille, Ion Channels of Excitable Membranes. 3rd edition Sinauer Associates, Inc., 2001
- 2) 岡田泰伸編、「パッチクランプ実験技術法 第2版」 吉岡書店 2001