

氏 名（本籍） え び はら さとる
海 老 原 覚

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 1 9 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 6 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 研 究 科
（ 博 士 課 程 ） 内 科 学 系 専 攻

学 位 論 文 題 目 Development of gramicidin perforated
patchclamp method : GABA response with
intact intracellular chloride concentrations.
（ グ ラ ミ シ ジ ン 穿 孔 パ ッ チ ク ラ ン プ 法 の 開 発 : 本
法 による GABA 応答の記録）

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員 教 授 白 土 邦 男 教 授 平 則 夫

教 授 西 山 明 徳

論文内容要旨

【目 的】

従来のホールセル様式を用いたパッチクランプ法は細胞内外のイオン組成を自在にコントロールできる半面、本来細胞が有するイオン環境を破壊してしまいチャンネルを介する反応が生理的イオン濃度勾配で観察できなくなるという欠点がある。さらに個々の細胞内イオン濃度を正確に測定することは大変高度な技術を行使しなければならない。そこで、本研究では最も測定が難しい、細胞内クロライドイオンに焦点をあて、これを生理的濃度に保ったまま膜電位を固定できる新しいパッチクランプ法の開発を試み、それを哺乳類の中樞神経細胞に適用した。

【方 法】

陽イオンイオノフォアであるグラミシジンを含むピペット内液を用いてセルアタッチの状態を確立するとパッチ膜上に一価の陽イオンだけに透過性を有するグラミシジンチャンネルを形成する。このことを利用し、パッチ電極内液に含まれる高濃度クロライドイオンを細胞内に全く拡散させることなく、細胞内のクロライドイオンを生理的条件下に維持したままで、膜電位固定下にクロライド電流を記録できる新しい穿孔パッチクランプ法を開発した。本法を生後 12-14 日のラット黒質網様質から酵素により急性単離した神経細胞に適用し、GABA で惹起される電流を測定した。

【結 果】

1) グラミシジン穿孔パッチ法によりギガオームシール達成後、約 40 分でパッチ膜の通電性は良好な状態になった。2) 膜電位を静止膜電位付近に固定した時、GABA は外向き電流を用量依存性に惹起した。GABA-A のアゴニストであるムシモールはより低濃度でこの外向き電流を惹起した。3) GABA 惹起の外向き電流は GABA-A のアンタゴニストであるピククリンおよびクロライドチャンネルブロッカーであるピクロトキシンにより用量依存性に抑制された。以上の薬理学的性質によりこの GABA 応答は GABA-A 受容体を介していることがわかった。4) GABA 応答の逆転電位は細胞外液のクロライドイオン濃度を変化させるとネルンストの式にしたがって変化した。このことよりこの GABA 惹起の外向き電流はクロライド電流であることが明らかになった。5) GABA 応答がクロライド電流であることを利用して、逆転電位と細胞外のクロライドイオン濃度から細胞内のクロライドイオン濃度が算出できる。これによって測定された黒質細胞の細胞内クロライドイオン濃度をその活量で表したものの平均値は約 10mM

であった。6) 細胞内の陽イオン還流が細胞内クロライドイオン濃度に及ぼす影響について様々な陽イオン組成のピペット内液を用いて調べたが、細胞内クロライドイオン濃度に変化はみられなかった。7) 膜電位を様々な保持電位に5分間保持したのち、GABAの逆転電位を調べると保持電位 -100 から -40 mVの範囲ではGABAの逆転電位には変化がなかった。以上のことより我々が求めた黒質細胞の細胞内クロライドイオン濃度はその細胞が本来有している生理的細胞内クロライドイオン濃度であることが確認された。8) GABA応答のペントバルビタールによる増強率をグラミシジン穿孔パッチクランプ法による細胞内クロライドイオン濃度が生理的な場合とナスタチン穿孔パッチクランプ法による細胞内を 150 mMのクロライドイオンで人工的に還流した場合とで比較した。すると前者は約 150% 、後者は約 230% と違う増強率を示した。したがって、細胞内クロライドイオン濃度が生理的な場合と非生理的な場合とでは受容体応答の薬理的性質が変わってくることを示唆された。9) スライスパッチ法を使って黒質細胞にこのグラミシジン穿孔パッチ法を適用すると、抑制性および興奮性シナプス後電流を電流の方向の違いから容易に区別できた。10) 抑制性シナプス後電流はビククリンによって完全に抑制された。このことより、GABAは黒質細胞において抑制性伝達物質として働いていることが証明された。

【 考 察 】

以上の結果は、黒質細胞の細胞内クロライドイオン濃度はそこでの神経伝達物質であるGABAが静止膜電位レベルでGABA-A受容体を介して外向きクロライド電流を惹起するのに十分な低濃度で存在することを示した。今回開発したグラミシジン穿孔パッチクランプ法は生理的な細胞内クロライドイオン濃度の環境を維持したままで、クロライドイオンが主役となる細胞応答を記録できることがわかった。今後、この方法を様々な細胞に適用することにより、この方面のさらなる解析が見込まれる。

審査結果の要旨

本論文は細胞内環境を生理的条件下に保ちながら行うことができるパッチクランプ法の開発と応用に関する研究である。従来手法では不可能であった、全く新しい概念に基づく方法であり、今後の発展性が極めて高いパッチクランプ法と言える。

イオンチャネルは生物の生理機能の維持に必要な不可欠な機構であり、その機能の解明は直接および間接的に生命現象の解明につながる。現在、イオンチャネルを研究する最も有効な生物物理学的手法はパッチクランプ法であり、それを使った多くの研究がなされている。しかしながら、従来のホールセル様式を用いたパッチクランプ法は細胞内外のイオン組成を自在にコントロールできる半面、本来細胞が有するイオン環境を破壊してしまいチャネルを介する反応が生理的イオン濃度勾配で観察できなくなるという欠点がある。さらに個々の細胞内イオン濃度を正確に測定することは非常に困難である。そこで著者は、陽イオンイオノフォアであるグラミシジンを含むピペット内液を用いてこの二つの困難を克服することに成功した。つまりパッチ膜上に形成されるグラミシジンチャネルを通して、細胞内のクロライドイオンを生理的条件下に維持したままで、膜電位固定できる新しい穿孔パッチクランプ法（グラミシジン穿孔パッチクランプ法）の開発に成功した。著者がこの方法をラット黒質網様質から急性単離した神経細胞に適用し、GABAで惹起される電流を解析することにより得られた新知見は要約すると以下ようになる。1) 黒質細胞においてGABAは外向き電流を惹起する。2) 黒質細胞におけるGABA惹起の外向き電流はGABA-A受容体を介している。3) このGABA惹起の外向き電流はクロライド電流である。4) 黒質細胞の細胞内クロライドイオン活量は約10mMである。5) GABA応答のペントバルビタールによる増強率は細胞内クロライドイオン濃度が生理的な場合と非生理的な場合とでは変わってくる。さらに著者は、スライスパッチ法とグラミシジン穿孔パッチクランプ法を組み合わせることにより、GABAが黒質細胞において抑制性伝達物質として働いていることを証明しており、グラミシジン穿孔パッチ法の応用範囲が広いことを伺わせている。

このように今回開発したグラミシジン穿孔パッチクランプ法により生理的な細胞内クロライドイオン濃度の環境を維持したままで、クロライドイオンが主役となる細胞応答を記録することができる。今後、この方法を様々な細胞に適用することにより、さらなる新しい解析が可能となるものと思われる。

したがって、本論文は目的、方法、結果、考察とも過不足なく述べられており、また今後の細胞生理学の発展に大きく貢献するものと思われ、よって学位論文として充分妥当なものと考えられる。