

学位論文

ルシファーイエローの
各種イオンチャネル電流に対する作用

九州工業大学大学院 生命体工学研究科

竹内 啓太

本論文の構成と概要

本論文は、3章で構成される。第I章では、膜不透過性蛍光色素、ルシファーイエローの典型的な使用法および味蕾細胞にルシファーイエローを用いた経緯について概説する。また、このとき発見したルシファーイエローの問題点に触れ、本研究の目的および各章の構成について述べる。

第II章では、味蕾細胞およびマウス培養海馬神経細胞が発現する各種イオンチャネルに対するルシファーイエローの薬理作用を示す。その結果、光照射によってルシファーイエローが少数のイオンチャネルを修飾することを報告する。

第III章では、ルシファーイエロー作用を引き起こす物質が活性酸素種であること、活性酸素種が比較的長い寿命を持つこと、を報告する。

目次

目次	3
I. ルシファーイエローによる細胞機能障害	5
II. 各種イオンチャネルに対するLY修飾作用	13
II-1. 序論	14
II-2. 材料および方法	18
a. 剥離舌上皮標本の作製	18
b. マウス海馬神経細胞の培養	18
c. N1E-115 の解凍	20
d. N1E-115 の継代培養	20
e. 海馬神経細胞の単離および培養、N1E-115 培養に用いる機器	20
f. 電気生理学的測定法	21
g. 露光	25
h. カーブフィット	25
i. 溶液	26
II-3. 結果	31
a. 電位依存性Na ⁺ チャネル	31
b. その他の電位依存性チャネル	36
c. 神経伝達物質受容体チャネル	47
II-4. 考察	56
III. 修飾作用のメカニズム	59
III-1. 序論	60
III-2. 材料および方法	62
a. 剥離舌上皮標本の調製	62
b. 味蕾細胞の電気生理学的測定法	62
c. 照明	62
d. カーブフィット	63
e. DTT処理	63
f. 溶液	63
g. 刺激溶液	64
III-3. 結果	65
a. DTT処理の効果	65
b. 暗黒下における遅延のpre-露光依存性	69
c. 検鏡のための光照射による遅延	72

d. LY作用の時間依存的減衰	75
e. SODによるLY作用の阻害	77
III-4. 考察	81
結語	88
参考文献	90
謝辞	98

I . ルシファーエラーによる細胞機能障害

細胞の機能を知るうえで、その構造を知るとはとても重要である。光学顕微鏡や電子顕微鏡の開発だけでなく、細胞染色技術の開発も不可欠である。このような先人の努力によって、私たちは細胞の形態や特定のタンパク質の所在を目で見ることができる。ルシファーイエローCH (LY) による細胞標識は、このような成果の一つである。しかし、すべての測定という行為は、程度の差はあるが、測定対象の状態を変化させる。したがって、研究者は使用する測定方法が引き起こす状態変化の程度を知っておく必要がある。

LYは、膜不透過性蛍光色素であり、細胞内に注入すると細胞内に拡散するが、細胞外には拡散しない。このため、細胞の形態、特に電氣的性質と形態の関係、を明らかにするため、利用されてきた。典型的な使用方法では、ガラス微小電極にLYをあらかじめ入れておき、細胞の電気現象を測定後、電気泳動的方法などで細胞内に拡散させる (Wildman et al., 2002; Michelson et al., 1994)。ガラス微小電極の開口部は小さいため、電気測定中の細胞内への拡散は、無視できると考えられてきた。パッチクランプ用電極にLYを入れる場合もある (Vogalis et al., 2005)。パッチクランプ用電極は電極先端の開口部が大きいため、電気測定中に細胞内に拡散する (図1-1)。

細胞によっては細胞間にギャップ結合と呼ばれる細胞間イオンチャンネルを発現するものがある。ギャップ結合が分子量1000以下の物質を通すことから (Loewenstein, 1981; Kumar and Gilula, 1996; Saez et al., 1989; Sanderson et al., 1994)、分子量457.2のLY (図1-2) は、ギャップ結合を調べるためにも、細胞内に注入されてきた (Takeda et al., 2004; Jagger and Forge, 2006; Zampighi et al., 2005)。細胞内に注入した蛍光色素が近隣の細胞に移動すれば、すなわち dye-couplingが生じれば、その細胞間にギャップ結合が存在することの証明となる (図1-3)。

このように、LYは単一細胞の形態ばかりでなく、ギャップ結合を持つ細胞の形態、ギャップ結合で連結される細胞数などの形態、そして多くの場合、これらの形態と電氣的性質の関係を調べるため、多様な細胞に注入されてきた。しかし、その薬理的性質が検討されることはなかった。最初に、そして頻繁に利用されたガラス微小電極との組み合わせでは、細胞内への受動的な拡散が起こりにくかったためであろう。しかし、電気測定中

に細胞内へLYを拡散させてしまうパッチクランプ用電極との組み合わせでは、LYの薬理作用を検討する必要がある。

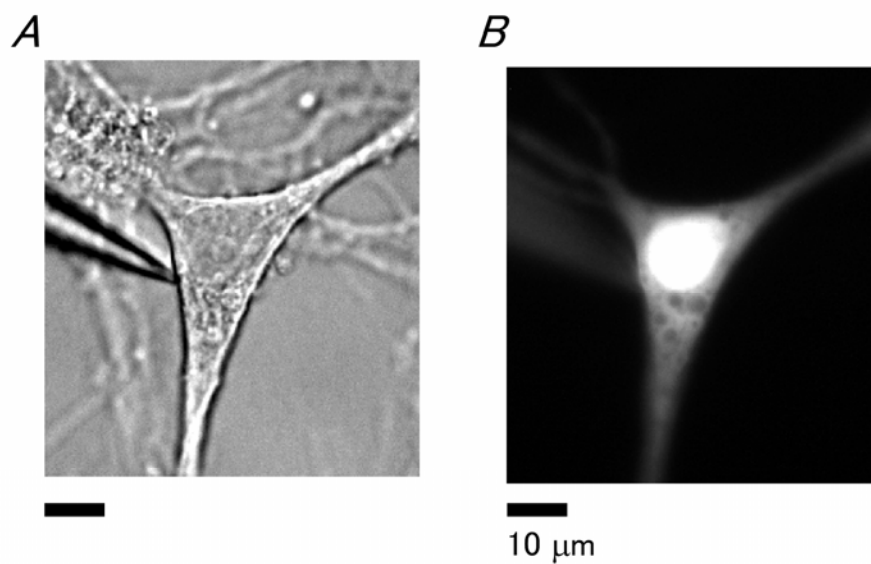


図 1-1 パッチクランプ用電極から培養海馬神経細胞内への LY の拡散

A, 微分干渉画像。ホールセルクランプ法で培養海馬神経細胞を電位固定下に置いている。*B*, *A* の蛍光画像。パッチクランプ用電極から細胞内へ拡散した LY が蛍光を発している。スケールバーは共通。

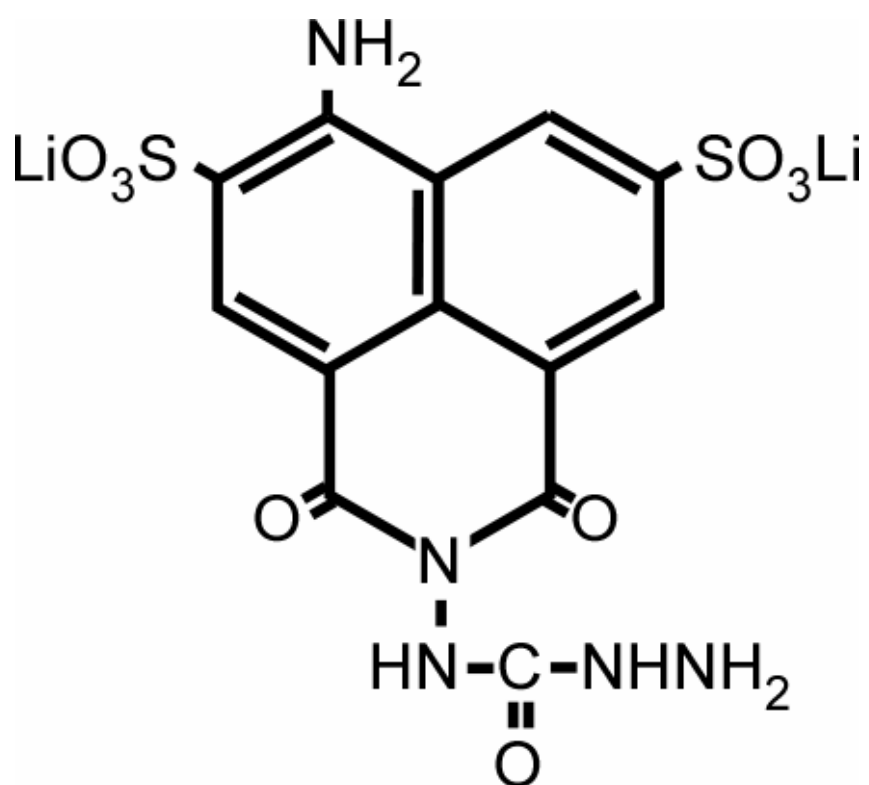


図 1-2 LY の化学構造

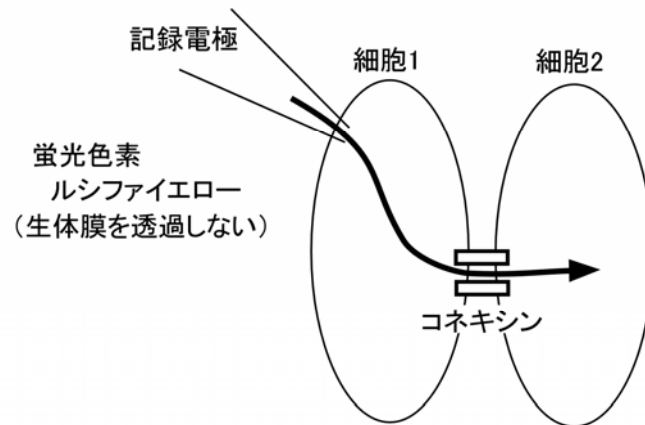


図 1-3 Dye-coupling の模式図

細胞 1 に注入した蛍光色素ルシファイエロー (LY) は細胞間のギャップ結合を通り、細胞 2 まで拡散する。色素の拡散を観測することで、細胞間のギャップ結合を確認できる。

現在までのほ乳類味蕾細胞の研究では、多くの場合、単離味蕾細胞が用いられてきたため、dye-couplingを観察することは不可能だった。古江らは、剥離舌上皮標本を用いたin-situ patch clamp法を開発した (Furue and Yoshii, 1997; Furue and Yoshii, 1998)。剥離舌上皮標本では、味蕾構造が保存されているため、dye-couplingによってギャップ結合の有無を調べるには好都合である。大坪は、この方法を用いて、味蕾細胞間dye-couplingを発見し、ギャップ結合の存在を明らかにした (大坪, 2002)。私は、味蕾細胞間ギャップ結合の研究を進めるために、大坪の報告を追試し、味蕾細胞のdye-couplingを確認した (図1-4)。さらに、私は、味蕾の外縁細胞 (perigemmal cell) 間でdye-couplingが高頻度で起こることを発見した (図1-5)。このようにギャップ結合を研究している際、偶然に、LYがTTX感受性・電位依存性Na⁺チャネルの不活性化過程を阻害することを発見した (Higure et al., 2003)。

LYに限らず、励起された蛍光色素が細胞の機能に影響を与えるという報告は、フルオレセインの派生物質のATP感受性K⁺チャネルに対する作用 (de Weille et al., 1992)、Ca²⁺感受性の蛍光指示薬であるFluo-3、Fura-redの持続性Na⁺電流増強作用 (Somjen, 2000)、ローズベンガルの電位依存性K⁺チャネル電流抑制作用 (Duprat et al., 1995) などが報告されている。また、光照射そのものがNMDA受容体の酸化還元部位を変化させて電流を増大させるという報告もある (Leszkiewicz et al., 2000; Leszkiewicz and Aizenman, 2002)。ローズベンガルは、光依存的に活性酸素を生成し、薬理作用を示すことが明らかにされている (Duprat et al., 1995)。しかし、上に述べたローズベンガル以外の色素を用いた研究では、細胞機能に影響を与える物質を同定していない。

本論文第II章では、電位依存性Na⁺チャネルを始めとした各種電位依存性チャネル、神経伝達物質受容体チャネルに対するLYの作用を示す。第三章では、LY作用を引き起こす物質が活性酸素種であることを示す。また、LYによる修飾作用のメカニズムや内在性活性酸素のイオンチャネルに対する作用や役割について論じる。

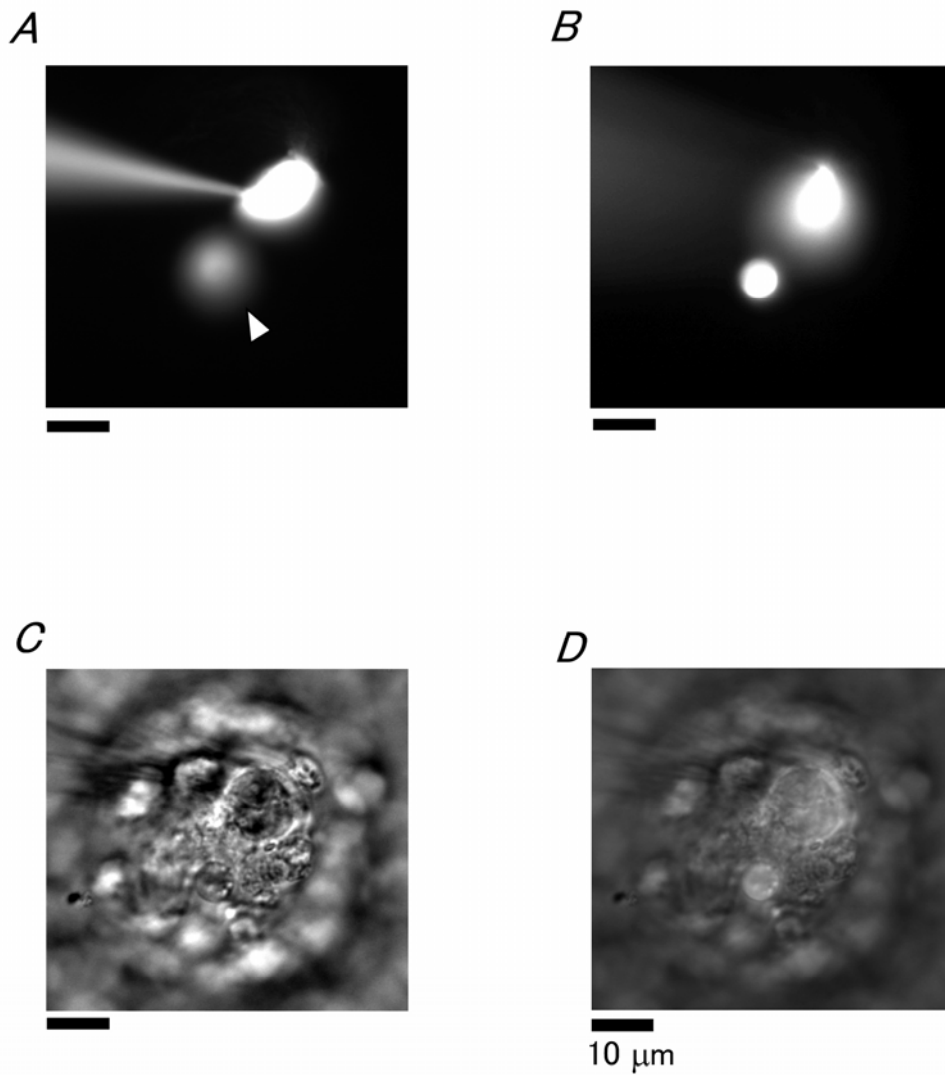


図 1-4 味蕾細胞間の dye-coupling

A, 電極から直接 LY を注入された細胞とは別の味蕾細胞が蛍光を発している (矢頭)。B, 焦点を矢頭で示した細胞に合わせた蛍光画像。C, B の微分干渉画像。D, B と C を重ね合わせた画像。スケールバーは共通。

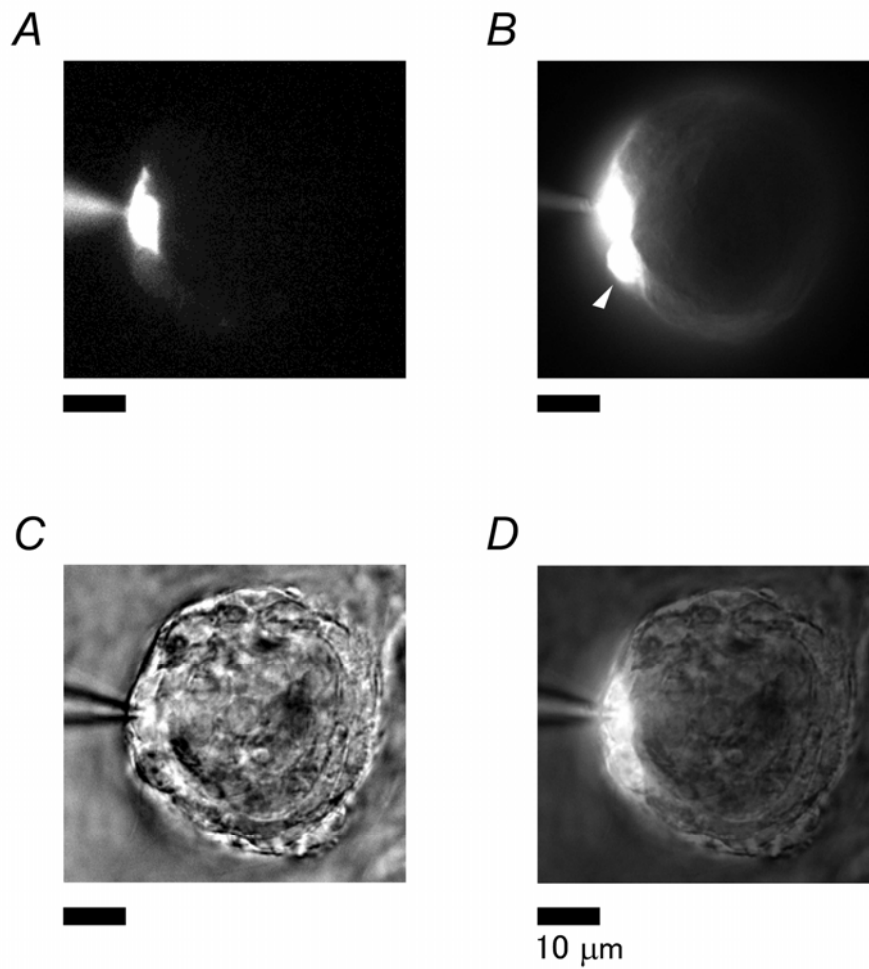


図 1-5 味蕾の外縁上皮細胞（perigemmal cell）間の dye-coupling

A, LY を注入して 15 秒後の蛍光画像。 B, LY を注入して 15 分後の蛍光画像。別の細胞まで LY が拡散している（矢頭）。 C, B の微分干渉画像。 D, B と C を重ね合わせた画像。スケールバーは共通。

II . 各種イオンチャネルに対するLY修飾作用

II-1. 序論

イオンチャネルの中には、電位に依存して開閉するもの、神経伝達物質やセカンドメッセンジャーなど化学物質に依存して開閉するものがある。これらのイオンチャネルは、構造にも大きな相違がある。たとえば、電位依存性チャネルの多くは、細胞膜を6回貫通することを1単位とし、合計4単位で一つのチャネル通路を形成する (Hille, 2001)。一方、化学物質依存性チャネルでは、1単位あたりの膜貫通回数や、合計の膜貫通回数に多様性がある (Hille, 2001)。

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 受容体チャネルを例にとると、細胞膜を3回貫通することを1単位とし、合計4単位で一つのチャネル通路を形成する (Mayer and Armstrong, 2004)。制御機構や構造に相違はあっても、これらのチャネルは、電気信号を生成する上で、重要な役割を果たしている。

電位依存性Na⁺チャネルは、電位依存性の活性化ゲートおよび不活性化ゲートを持つ。活性化ゲートは、過分極で閉じ、脱分極によって開く。不活性化ゲートは、逆に、過分極で開き、脱分極によって閉じる。一過性のNa⁺電流は、脱分極によって活性化ゲートがすばやく開き、遅れて不活性化ゲートが閉じることによって生じる。電位依存性Na⁺チャネルの不活性化は、ball-and-chainモデル (図2-1) で説明されている (Armstrong and Bezanilla, 1977)。電位依存性Na⁺チャネルが開くとそのコンフォメーション変化によって、チャネルの細胞内開口部に負の電荷が現れる。ここにチャネルタンパクで形成されている正の電荷を持ったボールが吸着し、チャネルをふさぐことで、チャネルを不活性化する。このボールは、同じくチャネルタンパクから形成されるチェーンでチャネルにつなぎ止められている。遺伝子工学的研究も、ball-and-chainモデルを支持する。電位依存性Na⁺チャネルは、6個の膜貫通部分が4回繰り返し現れる構造を持ち (図2-2)、3回目と4回目の繰り返し間のループ部分 (不活性化ゲート) にボールが作用すると考えられている (Catterall et al., 2005)。私自身が参加した先行研究において、LYは、光依存的に電位依存性Na⁺電流の不活性化過程が遅延したことから、光酸化反応を介した何らかの作用を不活性化ゲートに与えると推測した (Higure et al., 2003)。

この章では、まず、LYが電位依存性Na⁺チャネルの不活性化過程を遅延することを示す。ここには、私が担当し、Higureら (2003年) の論文に発表済みの結果の一部も示す。次に、他の電位依存性チャネル電流、TEA

感受性・外向き整流性 K^+ チャネル電流、内向き整流性 K^+ チャネル電流に対するLY作用を示す。また、神経伝達物質受容体チャネル電流、とくに、AMPA受容体電流に対するLY作用を示す。

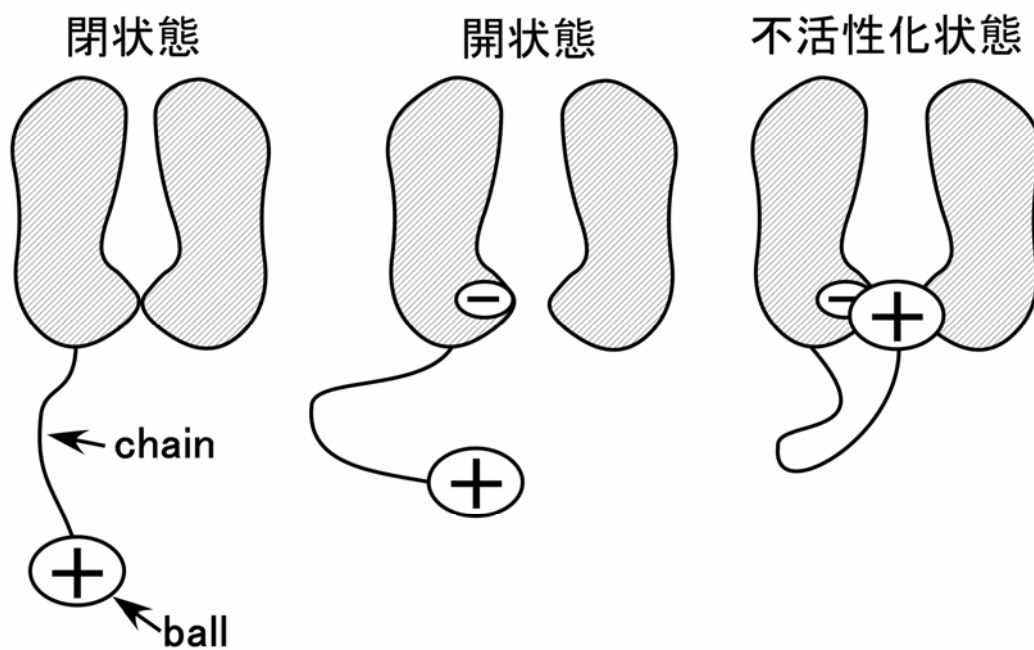


図 2-1 チャンネル不活性化の ball-and-chain モデル

チャンネルの開口によって現れる負電荷部位に正電荷を持ったボールが吸着する (Armstrong and Bezanilla, 1977 より改変)。

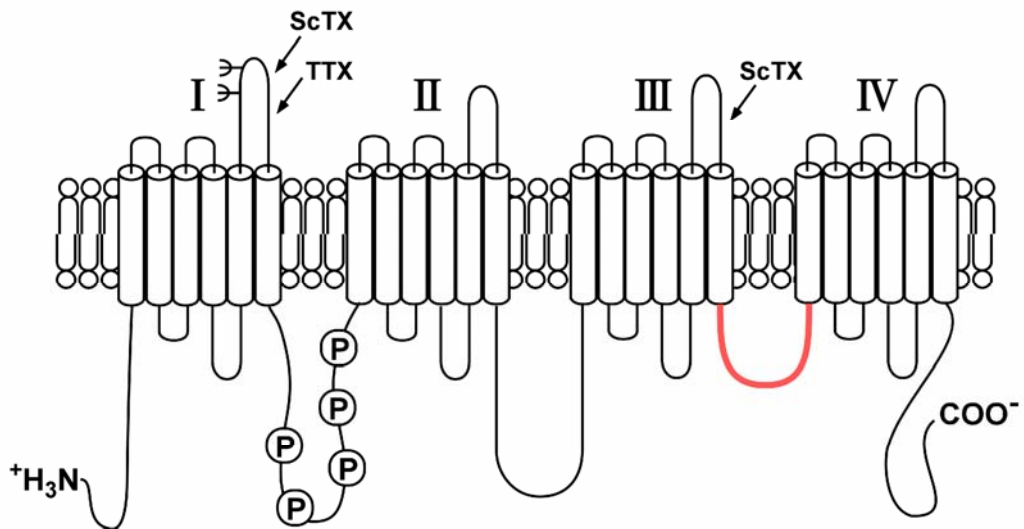


図 2-2 電位依存性Na⁺チャネルの膜貫通構造

6本の膜貫通部分からなるドメインが4回（I、II、III、IV）繰り返された構造をもつ。ドメインIIIとIVをつなぐループが不活性化ゲートを形成する（Catterall et al., 2005 より改変）。ScTX: Scorpion toxin 結合部位。TTX: Tetrodotoxin 結合部位。P: リン酸化可能部位。

II-2. 材料および方法

すべての実験は、九州工業大学動物実験指針を遵守しておこなった。

a. 剥離舌上皮標本の作製

剥離舌上皮は、古江らの方法に従って調製した（図2-3）（Furue and Yoshii, 1997; Furue and Yoshii, 1998）。5～8週齢マウス（Sea: ddY [SPF]）をエーテル麻酔下で断頭し、舌を切り出した。その後、舌表面が乾燥しないように素早く細胞外液に浸した。舌表面から注射針を舌先端部まで針入し、0.1 % エラスターゼ溶液約0.2 mlを皮下に注入した。その後すぐに、25℃で8～12分間酵素処理を行い、舌上皮を剥離した。酵素処理は、95%O₂/5%CO₂で飽和したEarle's 外液中で行った。剥離した舌上皮は、基底膜側が上になるようにプラットホームに固定し、水浸対物レンズ下にセットした。味蕾細胞基底膜側は、細胞外液で灌流した。この時、プラットホームの内側となる味蕾の受容膜側には、細胞外液を満たした。

b. マウス海馬神経細胞の培養

マウス（Sea: ddY [SPF] 胎児16日目）の海馬神経細胞を以下の手順で単離した（Furue et al., 1997; Noguchi et al., 1999）。ドラフト内で、マウスを麻酔（ジエチルエーテル）し、70%アルコールに浸した後断首した。その後、子宮を取り出し70%アルコールに浸し、素早くクリーンベンチ内に運んだ。子宮をリン酸緩衝液(PBS)溶液に浸し、胎児を取り出し別のPBS溶液に浸した。ガーゼ上に胎児を置き、曲と直のピンセットを使い、脳を取り出し、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 溶液に浸した。顕微鏡下で、脳から海馬を取り出し、メスを使って切り刻み、5 mlのトリプシン溶液を入れ、DNase 200 μlを加え、37℃で10分間インキュベートした。その後、5 mlの血清培地(5FH)を加え、1000 rpmで5分間遠心し、上清を捨てた後、2 mlの5FHを加え、トリチュレイトした。この溶液から40 μl取り、120 μlトリパンブルーの中に入れ、血球計算盤で細胞数を数えた。2.5×10⁴ cells / cm²になるように5FHで希釈し、カバーガラス（15 mm 丸、松波ガラス、大阪）を底に敷いた培養ディッシュにまいた。

単離した海馬神経細胞は、非働化した5FHを使い、37℃の5%CO₂インキュベータ内で1日培養した。翌日、少量の5FHを残し、無血清培地(B18)

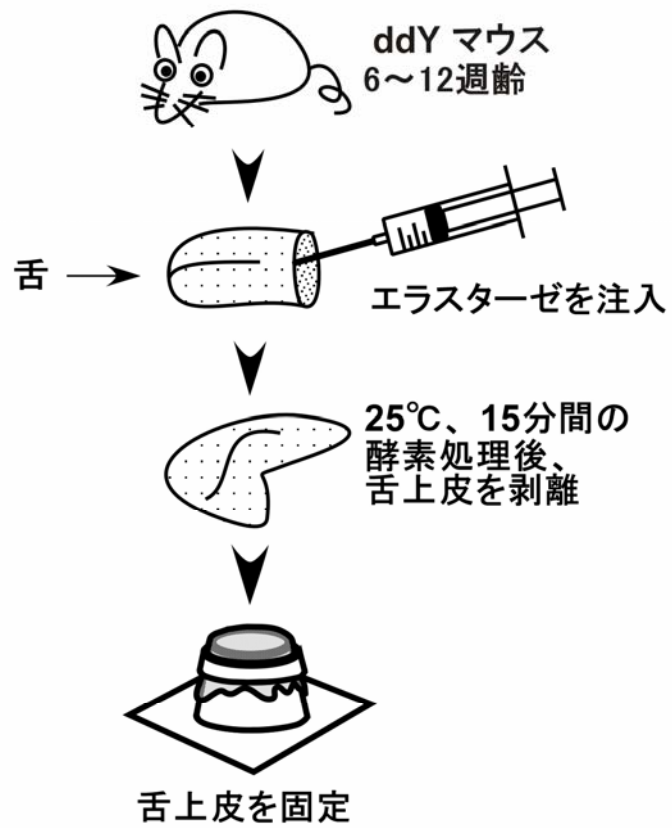


図 2-3 剥離舌上皮標本の調整

麻醉下で断頭したマウス舌にコラゲナーゼを注入し、舌上皮を剥離する。剥離した舌上皮は、剥離面（味蕾細胞基底膜側）が上になるように測定用プラットフォームにセットする。

(Brewer & Cotman, 1989) を約4 ml/dish入れ、37 °Cの5 %CO₂インキュベータ内で培養した。培養液は、1週間毎に新しい溶液と交換した。

c. N1E-115 の解凍

N1E-115は、以下の手順で培養した。凍結保存されたN1E-115を37°Cで素早く解凍した。その後5FHを10 ml加え、1000 rpmで5分間遠心し、上清を捨てた後、5FHを2 ml加え、沈殿した細胞塊を分散した。この溶液から40 μl取り、120 μlトリパンプルーの中に入れ、血球計算盤で細胞数を数え、 2.5×10^4 cells/cm²になるように5FHで希釈し、カバーガラスを底に敷いた培養ディッシュにまいた。

d. N1E-115 の継代培養

N1Eを以下の手順で継代培養した。培養ディッシュの古い培地を吸い取って捨てた。吸い取った培養液よりも多めのPBS溶液を静かに入れ、ディッシュをゆっくりと2~3回傾けて細胞層を洗った後、PBS溶液を取り除き、捨てた培地の1/2~1/3量のトリプシン溶液を加えた。約30秒後に溶液を細胞面が露出する間際まで吸い取り、37°Cに保温した。1~2分後、細胞を保温器から取り出し、顕微鏡で細胞の剥がれ具合を観察し、大部分の細胞が円形化し始める時点で5 mlの5FHを加え、ピペッティングにより細胞を完全に剥がし、細胞浮遊液をチューブに移し、1000 rpmで5分間遠心した。遠心後、上清を捨て、5FHを2 ml加え細胞を分散した。この溶液から40 μl取り、120 μlトリパンプルーの中に入れ、血球計算盤で細胞数を数え、 2.5×10^4 cells/cm²になるように5FHで希釈し、カバーガラスを底に敷いた培養ディッシュにまいた。

e. 海馬神経細胞の単離および培養、N1E-115 培養に用いる機器

使用する器具および溶液類は、全て無菌状態にした。単離した海馬神経細胞およびN1E-115を定着させるカバーガラスは、ガラス表面をきれいにするため、一晚濃硝酸溶液に浸し超純水で硝酸を除去した後、乾熱滅菌した。単離した海馬神経細胞およびN1E-115を入れる60 mmディッシュは、70%アルコールで拭いた後、クリーンベンチ内の紫外線に一晚当て滅菌した。その後、ディッシュにカバーガラスを重ねないように並べ、1Xポリ

リジン溶液を5~6 ml/dishずつ入れ、蓋を開けた状態で一晚滅菌した。培養する時は、素早くできるように次のような準備をしておいた。

- ・使用する溶液は37℃にしておいた。
- ・解剖器具（ハサミ、ピンセット等）は70%アルコールに浸しておいた。
- ・PBS溶液を2枚のシャーレに約20 mlずつ入れた。
- ・DMEM溶液を約20 mlシャーレに入れた。
- ・トリパンブルーを120 μ lエッペンドルフチューブに入れておいた。

f. 電気生理学的測定法

f-1. 味蕾細胞

ホールセルパッチクランプ法を用いて味蕾細胞を電位固定した（図2-4）。剥離した舌上皮を測定用プラットホームにセットし、水浸対物レンズ下に置いた。水圧式3次元マニピュレータ（MHW-103, 成茂, 東京）を用いて、電極内液を満たした記録電極を味蕾細胞付近まで接近させた。味蕾細胞に記録電極を接触させ陰圧をかけ、ギガオームシールを形成した。ギガオームシール形成後、記録電極に加える陰圧を増大させ、細胞膜を破り、電位固定電流を測定した。電位固定電流は、パッチクランプ用アンプ（Axopatch 200B, Axon instruments, Union City, CA, USA）で増幅し、A/Dコンバータ（DigiData 1322A, Axon instruments）を介してコンピュータのHDに記録した。解析には、市販の解析用ソフトPCLAMP（version 8.2, Axon instruments）を使用した。

記録電極は、ヘマトクリット毛細管（テルモ硬質ガラス）を用い、プレー（model PC-10, 成茂, 東京）で二段引きして作製した。ギガオームシールの形成を容易にするために、記録電極先端部をヒートポリッシュした。電極内液を満たした状態で、細胞外液に浸けた時の電極抵抗が、5~7 M Ω になるように作製した。不関電極は、塩橋（3M KCl / 2%寒天）を用いた。

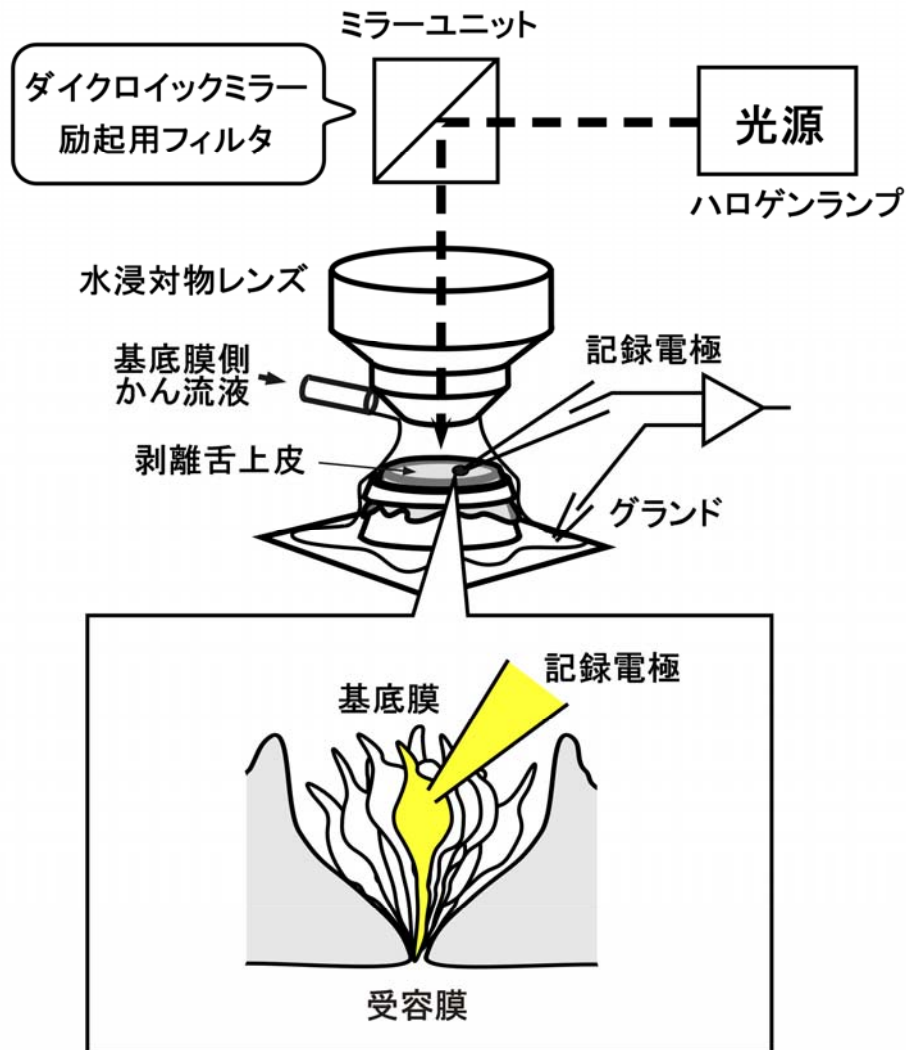


図 2-4 味蕾細胞の電氣的測定法

味蕾細胞基底膜側が上になるように測定用プラットホームに固定した剥離舌上皮を水浸対物レンズ下にセットし、ホールセルクランプ法で単一味蕾細胞の電気生理学的現象を測定する。LY 励起光源は、ハロゲンランプ。励起光はミラーユニットで反射され、味蕾細胞中の LY を励起する。蛍光は、ミラーユニットを透過し、CCD カメラ（図には示していない）で記録する。使用した励起光強度は、ダイクロイックミラーユニットの入り口で 5000 lx。

f-2. 培養海馬神経細胞

電気測定は、Hamillら (1981) のwhole cell patch clamp法に従って行った (図2-5)。60倍水浸対物レンズを装備した正立型顕微鏡下 (BX50, Olympus, 東京) に培養細胞測定用プラットホームをおき、対物レンズとの間の表面張力を利用して、水層を形成した。測定用プラットホーム中に培養5~10日目のマウス海馬単離神経細胞おき、電極内液を満たした記録電極を対物レンズと測定用プラットホーム間の水層に挿入した。機械式3次元マニピュレータ (NMN-21, 成茂, 東京) を用いて、記録電極を培養細胞まで接近させた。培養細胞に記録電極を接触させ、陰圧を加え、ギガオームシールを形成した。次に記録電極に加える陰圧を増大させ、記録電極と接触している部分の生体膜 (パッチ膜) を破り、ホールセルパッチを完成させた。ホールセルパッチ完成と同時に細胞内液に溶かして調製したLYは、細胞内に拡散した。

Outside-out パッチ法による記録も行った。細胞外液に浸ったパッチ電極から発生する浮遊容量を減少させるために、定法通りに記録電極のごく先端部分を除いた部分にシルガードを塗り、浮遊容量を減少させた。シルガードは、熱したニクロム線中を通して乾燥・固化させた後実験に使用した。また、ギガオームシールの形成を容易にするために、記録電極先端部をヒートポリッシュした。

培養細胞は、常に細胞外液で灌流した。whole cell patch clamp法およびOutside-out パッチ法で測定した電流は、味蕾細胞と同様に記録、解析した。

f-3. N1E-115

N1E-115の電気生理学的測定は、培養海馬神経細胞の項 (f-2) で記述した方法で行った。

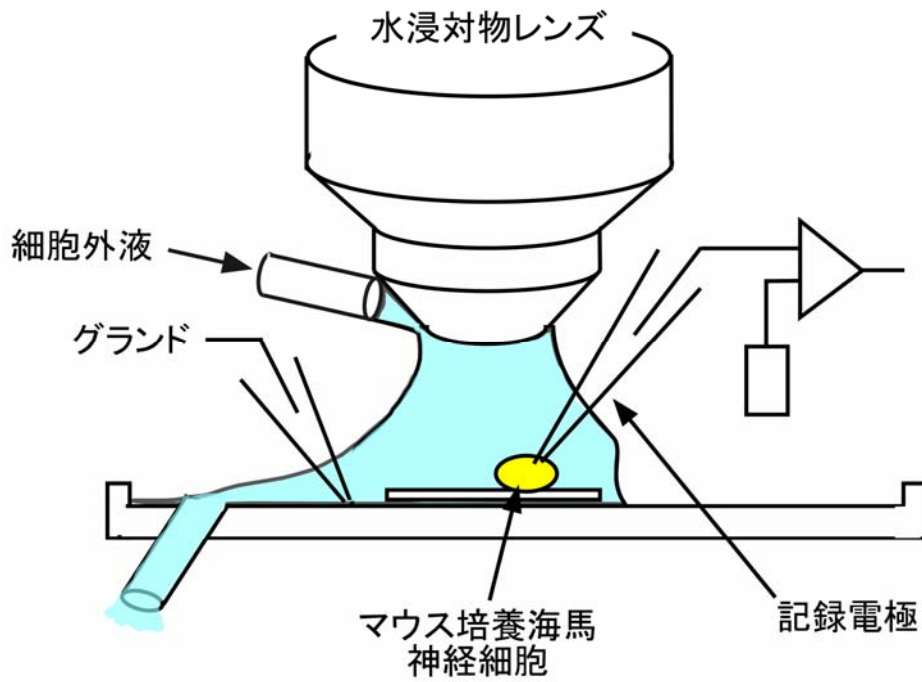


図 2-5 培養海馬神経細胞の電気生理学的測定法

水浸対物レンズ下に培養細胞測定用プラットフォームを置き、目視で細胞に記録電極を近づけ、ギガオームシールを作製し、電気生理学的現象を測定する。蛍光の測定方法は図 2-4 と同一。

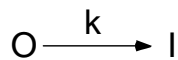
g. 露光

LYを励起する光は、直流の安定化電源によって制御された150 Wのハロゲンランプで生成し、400から440 nmの波長だけを透過するダイクロイックミラーユニット (U-MWIG, Olympus)、水浸対物レンズを通して神経細胞に照射した。使用した励起光強度は、ダイクロイックミラーユニットの入り口で5000 lxであった。励起されたLYの蛍光は、再び水浸対物レンズによって集め、cooled CCD camera (C4742-95-12, Hamamatsu Photonics K.K.) で取り込み、蛍光画像を得た。ダイクロイックミラーは、励起光より長波長の蛍光を透過するように設定した。

h. カーブフィット

電位依存性Na⁺チャンネルは3つの状態をとる。細胞膜が静止状態にあると、電位依存性Na⁺チャンネルは、閉じた状態にある。膜が脱分極することにより、電位依存性Na⁺チャンネルは開状態になる。電位固定下でこの開状態のチャンネルは、膜コンダクタンスの増加として記録できる。その後チャンネルは、不活性化状態になり、膜コンダクタンスは、制止時の値に戻る。

Na⁺チャンネルが、開いた状態 (O) から不活性化した状態 (I) へ速度定数kの一次反応にしたがって変化するものとする。脱分極時に不活性化は解除されないので、この仮定は大きな脱分極に対して有効である。それぞれの状態にあるチャンネルの数をそれぞれ [O]、[I] とする。



このとき

$$[O] = O_0 \cdot \exp(-kt)$$

となり、1/kから時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ を得る。ただし、 O_0 は、 $t=0$ で開いているチャンネル数を示す。

細胞内にルシファーイエローを注入したとき、不活性化しないNa⁺電流 (non-inactivating currents; NIC) が現れた (図2-6)。全Na⁺電流 (I_{Na}) は、不活性化するNa⁺電流 (I_{inact}) と不活性化しないNa⁺電流 (I_{NIC}) の和として、

$$I_{\text{Na}} = I_{\text{inact}, t=0} \cdot \exp(-t/\tau_{\text{inactivation}}) + I_{\text{NIC}}$$

と表し、カーブフィットによって時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ とNICの大きさを推定した。ただし $I_{\text{inact}, t=0}$ は $t=0$ のときの I_{inact} を示す。

i. 溶液

電気生理実験用溶液

細胞外液 (mM); 150 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 0.5 MgCl₂, 10 Glucose, 5 HEPES, pH 7.4 with NaOH

Earle's 外液 (mM) ; 116 NaCl, 5.37 KCl, 1.80 CaCl₂, 0.81 MgCl₂, 26.18 NaHCO₃, 1.01 NaH₂PO₄

5%CO₂/95%O₂が飽和した状態で、pHが7.4付近に安定するように作製した。

Ba²⁺ 外液 (mM) ; 10 mM BaCl₂, 10 mM TEACl, 130 NaCl, 5 HEPES, 10 Glucose, pH 7.4 with NaOH

Mg²⁺-free 外液 (mM) ; 145 NaCl, 5 KCl, 2.4 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucose, pH 7.4 with NaOH

Cs⁺内液 (mM); 120 CsCl, 15 NaCl, 5 MgCl₂, 5 Na₂ATP, 0.3 Na₃GTP, 10 HEPES, pH 7.2 with CsOH

K⁺グルコネート内液 (mM) ; 120 K-gluconate, 20 KCl, 2 MgCl₂, 2 Na₂ATP, 0.3 Na₃GTP, 10 EGTA, 10 HEPES, pH 7.2 with KOH

LY-Cs内液; Lucifer Yellow CH 2Li [SIGMA L0259]を2 mg / mlの割合でCs⁺内液に溶かした。

LY-Kグルコネート内液 ; Lucifer Yellow CH 2Li [SIGMA L0259]を2 mg / mlの割合でK⁺グルコネート内液に溶かした。

刺激溶液

Tetrodotoxin (TTX) 溶液 ; TTX [Wako 206-11071]を細胞外液で溶かし、1 μ Mになるように調製した。

Tetraethylammonium Chloride (TEA) 溶液 ; TEA [Wako 204-04502]をTTX溶液で溶かし、10 mMになるように調製した。

α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) 溶液 ; AMPA [TOCRIS 0169] を TEA 溶液で溶かし、5 μ M になるように調製した。

カイニン酸溶液 ; カイニン酸 [SIGMA K0250] を TEA 溶液で溶かし、20 μ M になるように調製した。

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 溶液 ; NMDA [SIGMA M3262] とグリシンを Mg-free 外液で調製した TEA 溶液で溶かし、それぞれ 30 μ M、1 μ M になるように調製した。

γ -aminobutyric acid (GABA) 溶液 ; GABA [Wako 010-02441] を TEA 溶液で溶かし、10 μ M になるように調製した。

Bicuculline 溶液 ; bicuculline [SIGMA B103] を GABA 溶液に溶かし、30 μ M になるように調製した。

セロトニン溶液 ; セロトニン [SIGMA H9523] を TEA 溶液で溶かし、10 μ M になるように調製した。

培養用溶液

海馬神経細胞および N1E-115 を培養する際に使用した溶液の組成を以下に示す。

- PBS (phosphate-buffered saline) 溶液
137 mM NaCl、2.67 mM KCl、8.09 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄
- DMEM 溶液 (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
ニッスイ DMEM 10 g/l NaHCO₃ 1.8 g/l glucose 3.5 g/l
- ポリリジン 10X 溶液
ポリ-L-リジン 臭化水素酸塩 0.5 mg/ml
PBS 溶液で 10 倍希釈し、1X として使用した。
- トリプシン 10X 溶液
トリプシン 25 mg/ml PBS 溶液
PBS 溶液で 10 倍希釈し、1X として使用した。
- DNase 溶液
DNase 2 mg/ml PBS 溶液
- 5FH 溶液
DMEM 溶液 450 ml、馬血清 25 ml、牛胎児血清 25 ml

• B18溶液

B18溶液は、各種ストックおよび用時調製品を以下の組成でDMEM液（高グルコース、含ピルビン酸）に溶かして調製した。

DMEM high glucose with pyruvate	1000 ml (最終量)
HEPES-Na (1M)	10 ml
5%BSA stock	50 ml
Aqueous stock	10 ml
Ethanollic stock	80 µl
Progesteron stock (200 µg/ml)	31.5 µl
Insulin stock (10 mg/ml)	400 µl
Transferrin stock (2 mg/ml)	2.5 ml
*T3 stock (2 µg/ml)	4 µl
*Catalase solution (0.8 mg/ml)	3.2 ml
*GSH (Glutathione) solution (0.5 mg/ml)	2 ml
*SOD (Superoxide dismutase) solution (0.5 mg/ml)	5 ml

*は非滅菌なので、約1.3倍量の溶液を作って濾過滅菌後加えた。

B18用各種ストックの組成および調製法を以下に示す。[]内は、シグマのカタログ番号を示す。

• Aqueous stock

L-Alanine	2 mg/ml
Biotine [B2639]	0.1 mg/ml
L-Calnitine [C0283]	2 mg/ml
Ethanolamine [0135]	1 mg/ml
D(+)-galactose [071-00032]	15 mg/ml
L-Proline	7.76 mg/ml
Putorescine [P5780]	16.1 mg/ml
Selenium [S5261]	0.016 mg/ml
Vitamine B12 [V6629]	0.34 mg/ml

100 mg/vial + 10 ml (超純水)

これを0.404 ml取り、超純水を11.59 ml加えた。

Zinc Suifate [268-00404]	0.194 mg/ml
--------------------------	-------------

*各々を10 ml取り濾過滅菌した。

• Ethanoric stock

Coriticosterone [C2505]	2 mg/ml
Linoleic acid [L1012]	100 mg/ml
100 mg/vial + 900 μ l (EtOH)	
すべてを一度に溶かしストックとした。	
Linoleic acid [L2376]	100 mg/ml
500 mg/vial + 4.5 ml (EtOH)	
すべてを一度に溶かしストックとした。	
Lipoic acid (DL-6.8-Thioctic acid [T1395])	4.7 mg/ml
Retinole, all trans [R7632]	10 mg/ml
25 mg/vial + 2.5 ml (EtOH)	
すべてを一度に溶かしストックとした。	
Retinyl acetate [R7882]	10 mg/ml
1 g/vial + 10 ml (EtOH)	
すべてを一度に溶かしストックとした。	
D-L- α -Tocopherol [T3251]	100 mg/ml
5 g/vial	
すべてを一度に溶かしストックとした。	
D-L- α -Tocopherol acetate [T3001]	100 mg/ml
各々を1 ml取り1 ml/tubeに分注し、冷蔵保存した。	

その他のstock

- Progesteron [P6149] 20 μ l/ml
1 mg/vial + 5 ml (EtOH) すべてを一度に溶かしストックとした。
- Transferrin [T7786] 2 mg/ml (DMEM)
濾過滅菌後、保存した。
- Insurine [I1882] 10 mg/ml
100 mg/vial + 10 ml (超純水) + 100 μ l (氷酢酸)
すべてを一度に溶かしてストックとしそれぞれ無菌的に加えた。
- T3 [T6397] 2 μ g/ml
5 mg + 10 ml (50% EtOH)
- Albumin bovine (BSA) [A9418] 5 g/100 ml (PBS)
低温室でOver Night攪拌した。翌日、10000 rpmで20 min遠心し、濾過滅菌した。
- HEPES-Na (1M) 23.83 g/100 ml
10M NaOHでpH7.4にした。

用時調製

- Catalase [C6665] 0.8 mg/ml
- Glutathione [G077-02011] 0.5 mg/ml (PBS溶液)
- Superoxide dismutase [S5395] 0.5 mg/ml

II-3. 結果

a. 電位依存性Na⁺チャネル

a-1. 不活性化遅延作用

味蕾細胞を-70 mVに電位固定し、その状態から-20 mVに脱分極し、電流を測定した。LYを4.2 mM含むCs内液を用いると、励起光（5000 lx、“材料および方法”の“露光”参照）照射下で電位依存性Na⁺チャネル電流の不活性化は遅延した（図2-6）。また、不活性化をしない電流（non-inactivating current; NIC）が現れた。電流の不活性化過程をカーブフィットし、不活性化の時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ とNICを計算した。味蕾細胞に4.2 mM LYを注入すると、310秒間励起光照射によりNa⁺電流不活性化の時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ は、1.83 ms（励起光照射前）から4.70 msまで増大した。励起光照射前に確認できなかったNICは、310秒間励起光照射により、-123 pA発生した。また、マウス培養海馬神経細胞においても同様の実験を行った結果、LYは、同様に不活性化の時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ の増大およびNICを発生させることがわかった。

a-2. 断続的励起光照射による遅延効果

励起光を断続的に照射し、 $\tau_{\text{inactivation}}$ およびNICの増加に対する効果を調べた（図2-7）。励起光（5000 lx）を照射すると τ は、増大し続けた。励起光の照射をとめている間（暗時）、 $\tau_{\text{inactivation}}$ は、変化しなかった。再び励起光を照射すると、 $\tau_{\text{inactivation}}$ は増大し続けた。励起光の照射時間に対応してNa⁺電流のピーク値で規格化したNIC（normalized magnitude of NIC; NMNIC）も、励起光を照射したときだけ増大し続けた（図2-8）。これらのことより、LYによるNa⁺電流の不活性化の遅延は、励起光照射時間に依存することがわかった。また、LYの効果は不可逆的であることもわかった。図2-7、8に示した結果は、すでに公表済みである（Figure et al., 2003）。これ以外のデータは、未発表である。

a-3. 活動電位に対する作用

マウス味蕾細胞と培養海馬神経細胞の活動電位に対するLYの作用を調べた（図2-9）。LYは、KClを主体とする電極内液には溶けないので、K⁺グルコネート内液を用い、K⁺チャネルの寄与が測定できるようにした。活動電位の持続時間は、励起光照射時間依存的に増大した。これらの結果から、励起されたLYは、活動電位にも作用することがわかった。

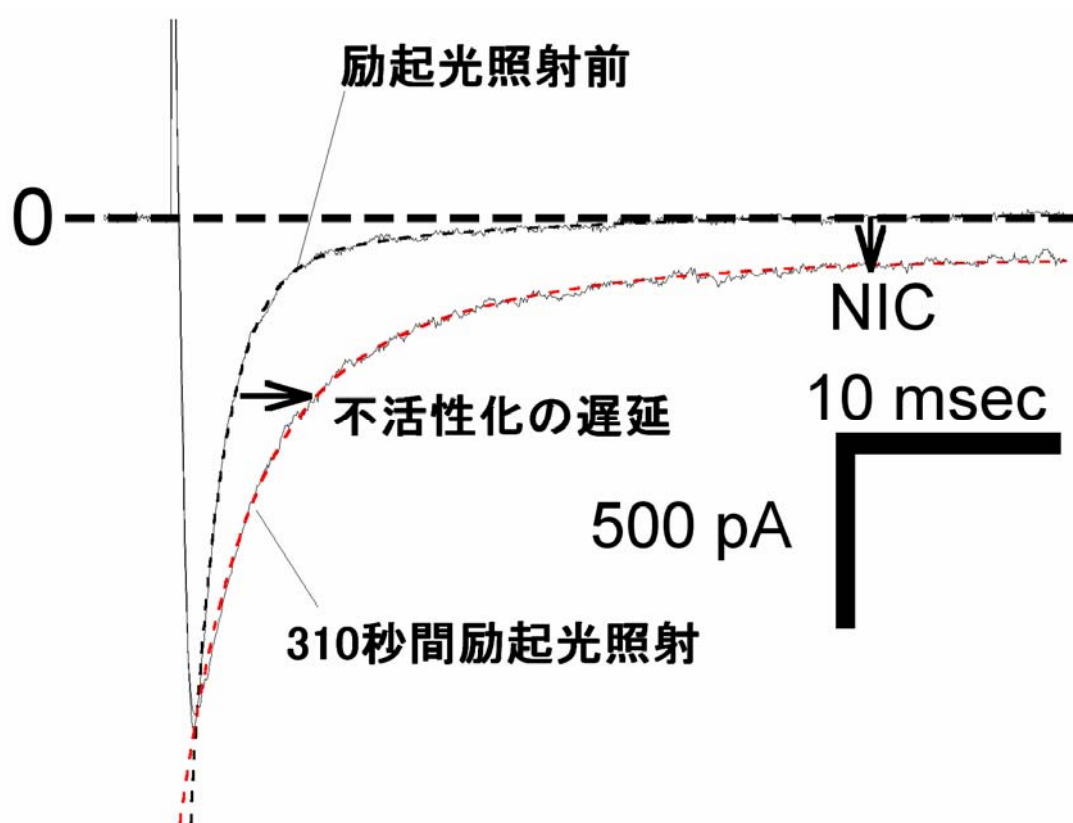


図 2-6 味蕾細胞内に注入したLYに対する励起光照射によるNa⁺電流不活性化の遅延と非不活性化電流（non-inactivating current、NIC）の発生

点線は、単一時定数での減衰を仮定した関数によるカーブフィット（本文参照）。相関係数；励起光照射前電流、0.995；310秒間励起光照射後、0.994。保持電位、-70mV。刺激電位、-20mV。励起方法は、本文参照。LY-Cs内液

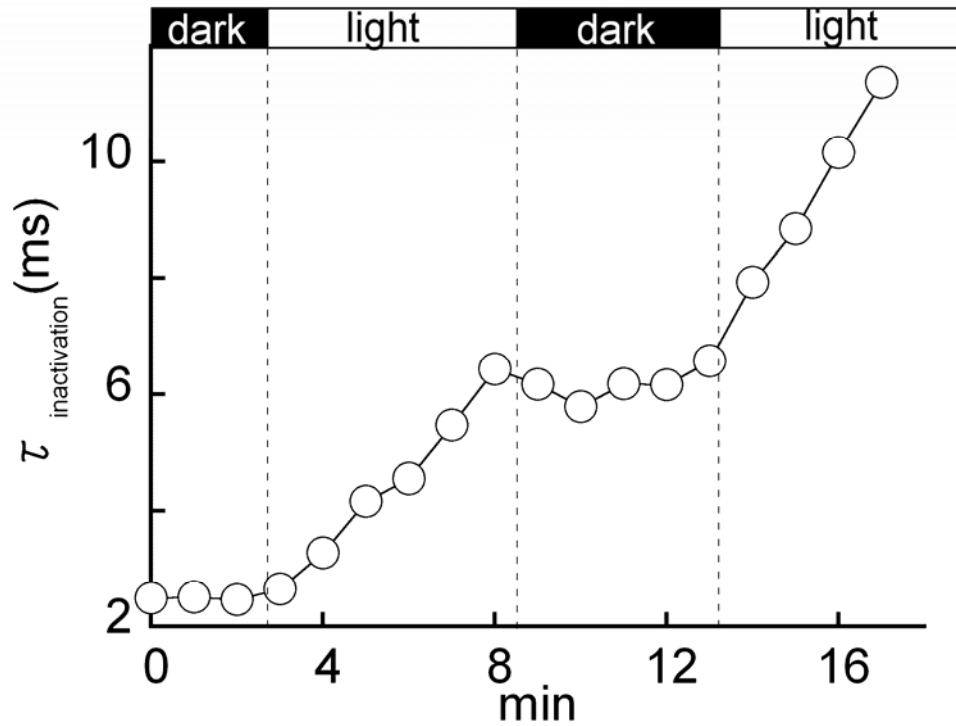


図 2-7 味蕾細胞電位依存性Na⁺電流不活性化時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ の励起光照射時間依存性

不活性化時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ の測定時間に対するプロット。励起光照射中 (light)、 $\tau_{\text{inactivation}}$ は連続して増大する。暗黒下 (dark) では、 $\tau_{\text{inactivation}}$ は一定。以下の図に置いて、dark、lightの意味は、すべて同じ。Figure et al. (2003) より引用。

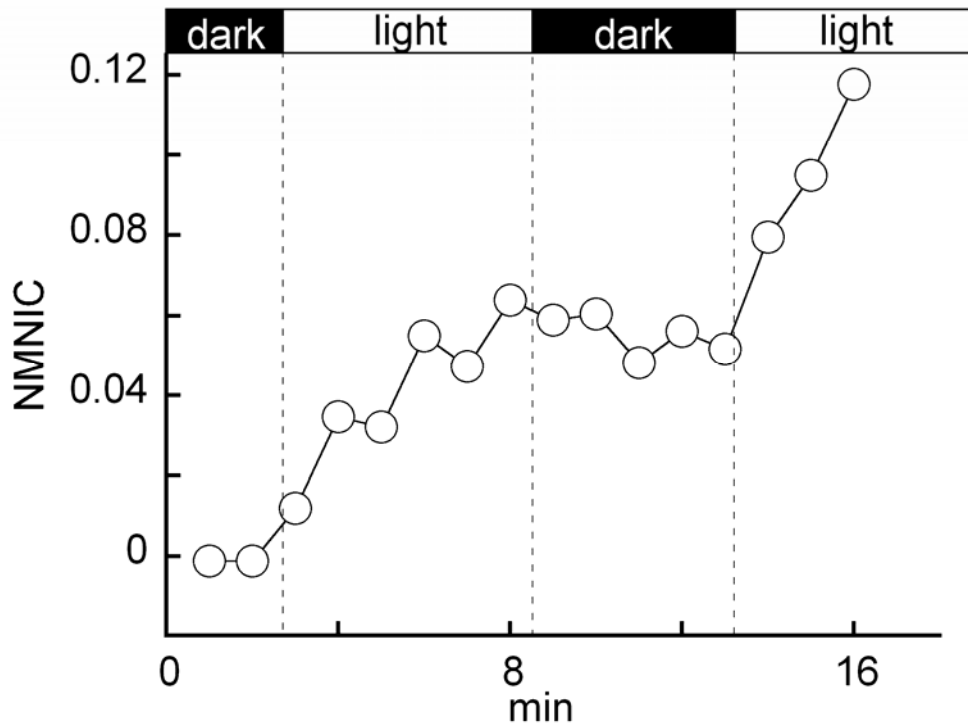


図 2-8 味蓄細胞電位依存性Na⁺電流に占める非不活性化電流NICの励起光照射時間依存性

各Na⁺電流のピーク値で規格化したNIC (normalized magnitude of NIC; NMNIC)の測定時間に対するプロット。NMNICは、light下で連続的に増大し、dark下で一定となる。Figure et al. (2003) より引用。

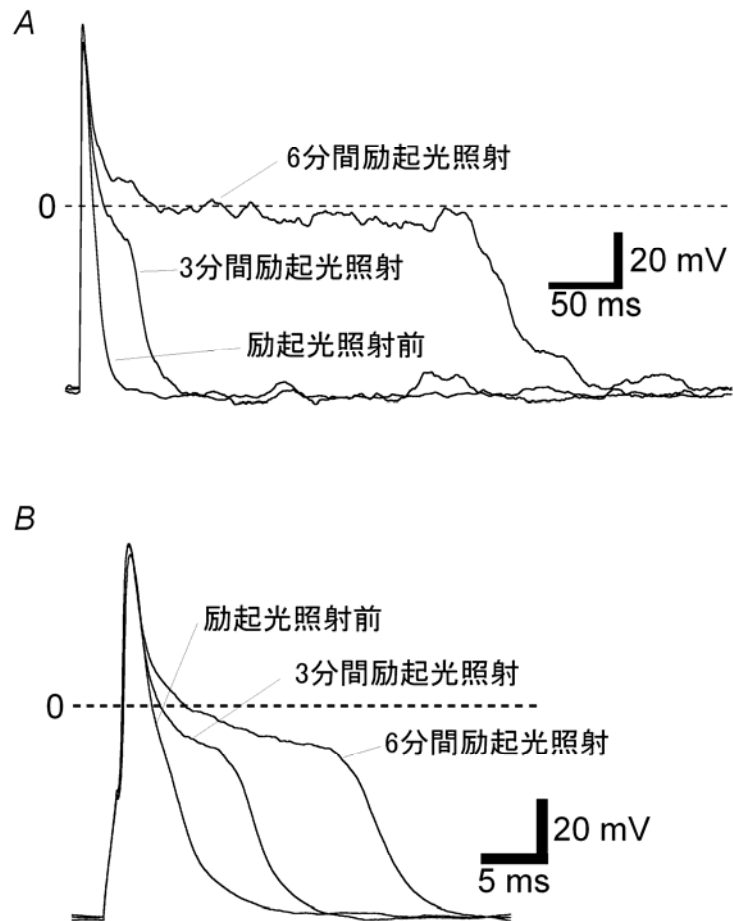


図 2-9 活動電位に対する異なる時間励起された LY の効果

A, 味蕾細胞の活動電位。保持電流 -60 pA 。刺激電流 200 pA 。刺激時間 1 ms 。
 B, 培養海馬神経細胞の活動電位。保持電流 -25 pA 。刺激電流 150 pA 。刺激時間 1 ms 。LY-K グルコネート内液。

b. その他の電位依存性チャネル

b-1. 電位依存性 K^+ チャネル

b-1-1. TEA感受性・外向き整流性 K^+ チャネル

外向き電流は、 K^+ 電流および Cl^- 電流が形成する。外向き整流性 K^+ チャネル電流は、細胞外に与えたtetraethylammonium chloride (TEA)によって可逆的に抑制される。外向き電流のTEA依存性は、培養海馬神経細胞毎に多少異ため、外向き電流が10 mM TEAで完全に抑制される細胞を選び、LYの作用を調べた(図2-10A)。すなわち、TEA感受性・外向き整流性 K^+ チャネル電流だけを発生する細胞を用いて、LYの作用を調べた。TEA感受性・外向き整流性 K^+ チャネル電流は、励起光照射時間依存的に増大した(図2-10B)。TEA感受性・外向き整流性 K^+ チャネルの逆転電位が E_K に一致すると仮定して、チャネルコンダクタンスをもとめた。チャネルコンダクタンスは、-20 mVから+65 mVの範囲で約1.3倍に増大した(図2-11B)。

TEA感受性・外向き整流性 K^+ チャネル電流は、活性化過程と不活性化過程を持っていた。励起光照射前と3分間励起光照射後の電流を規格化し、活性化過程および不活性化過程を比較した(図2-12)。励起光照射前後の電流がよく重なり合うことから、LYの作用は、活性化や不活性化の過程を変化させないと結論した。

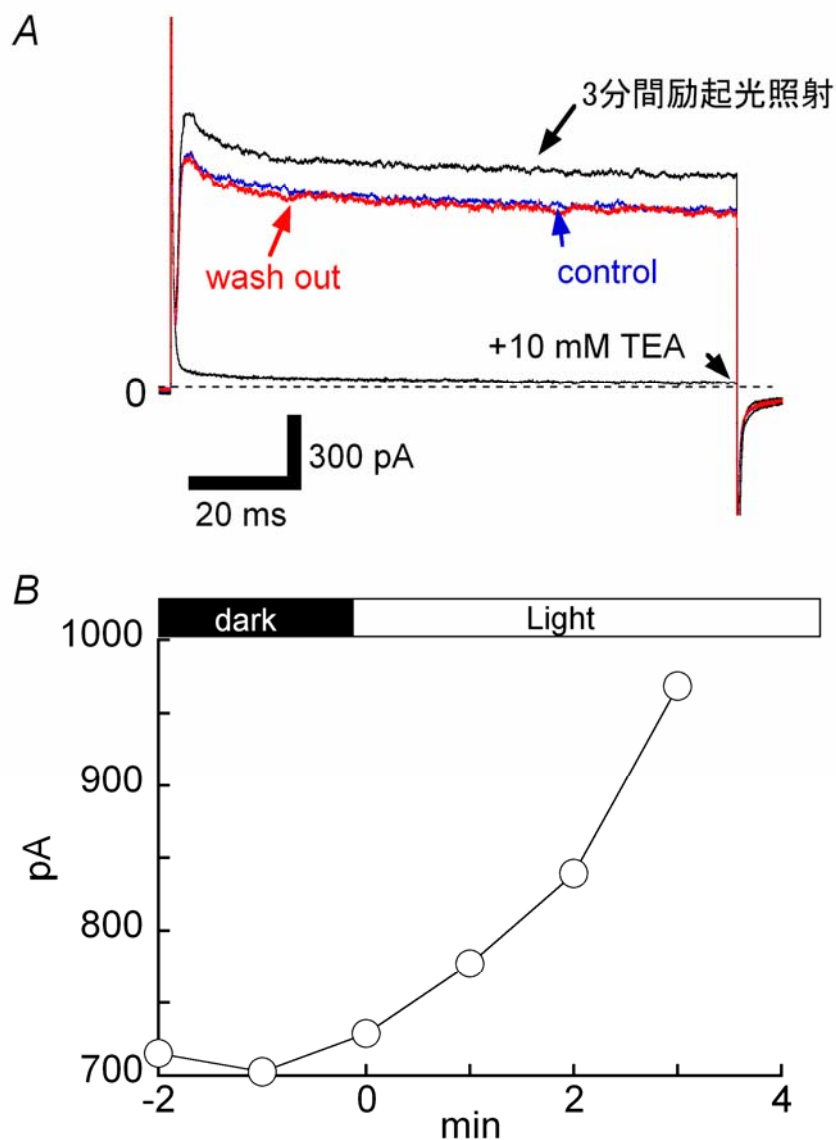


図 2-10 培養海馬神経細胞のTEA感受性・外向き整流性K⁺チャンネル電流に対するLYの作用

A, TEAの抑制作用から外向き電流のほとんどがTEA感受性・外向き整流性K⁺チャンネル電流であることがわかる(+10 mM TEA)。TEAを洗い流すと(wash out)、外向き電流は元のレベルまで回復し(control)、3分間の励起光照射によって増大している(3分間励起光照射)。保持電位 -85 mV。刺激電位 65 mV。

B, Aで示した細胞の励起光照射時間依存性。励起光を照射し始めた時間を0としている。刺激電位、65 mV。保持電位 -85 mV。定常状態電流(刺激電位に固定開始後 80 ms-85 msの電流の平均値)をプロット。LY-Kグルコネート内液。

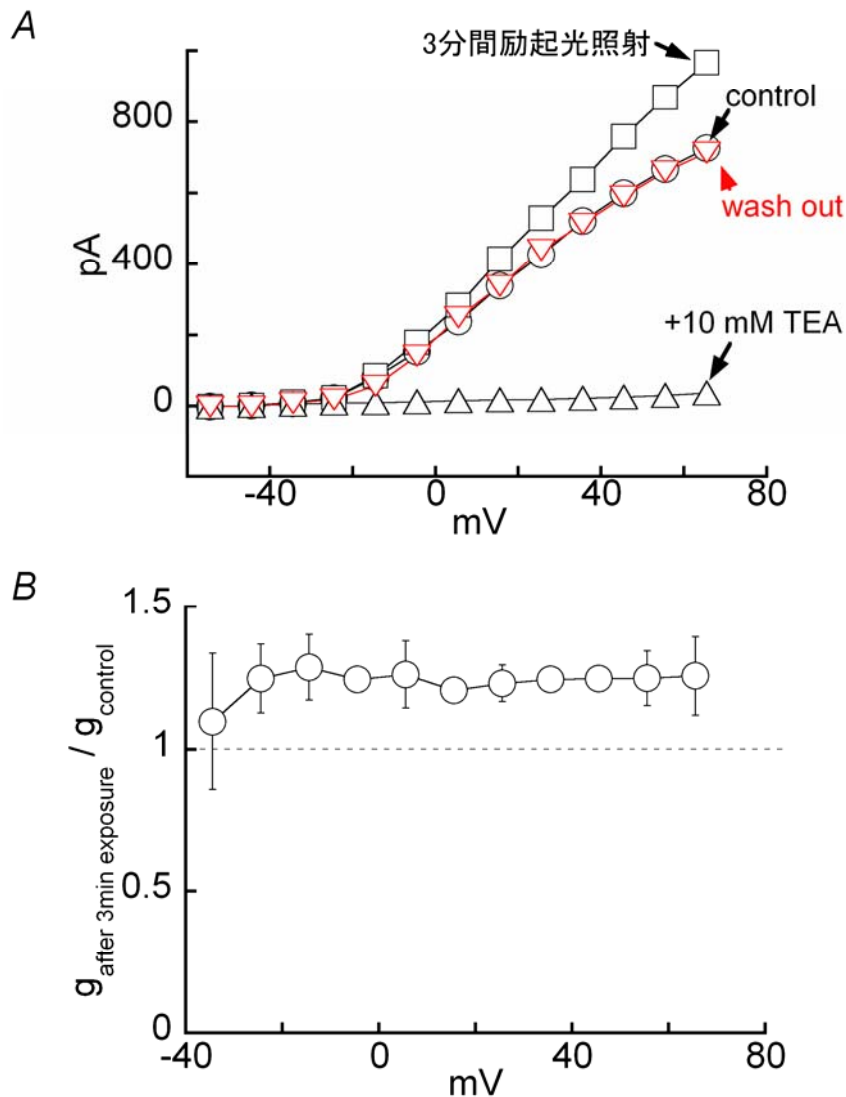


図 2-11 TEA感受性・外向き整流性K⁺チャンネル電流に対するLY作用の電位依存性

A, 図 2-10 で示した培養海馬神経細胞のTEA感受性・外向き整流性K⁺チャンネルの電流電圧曲線。定常状態電流（刺激電位に固定開始から 80 msから 85 msの平均値）をプロット。B, 3分間励起光照射後のコンダクタンスの電位依存性。各電位に対して励起光照射前のコンダクタンス（ g_{control} 、チャンネルの逆転電位をK⁺の平衡電位とした）と励起光照射後のコンダクタンス（ $g_{\text{after 3min exposure}}$ ）を求め、 g_{control} で規格化した値をプロットした。プロットしたデータは3細胞の平均値と標準偏差を示す。

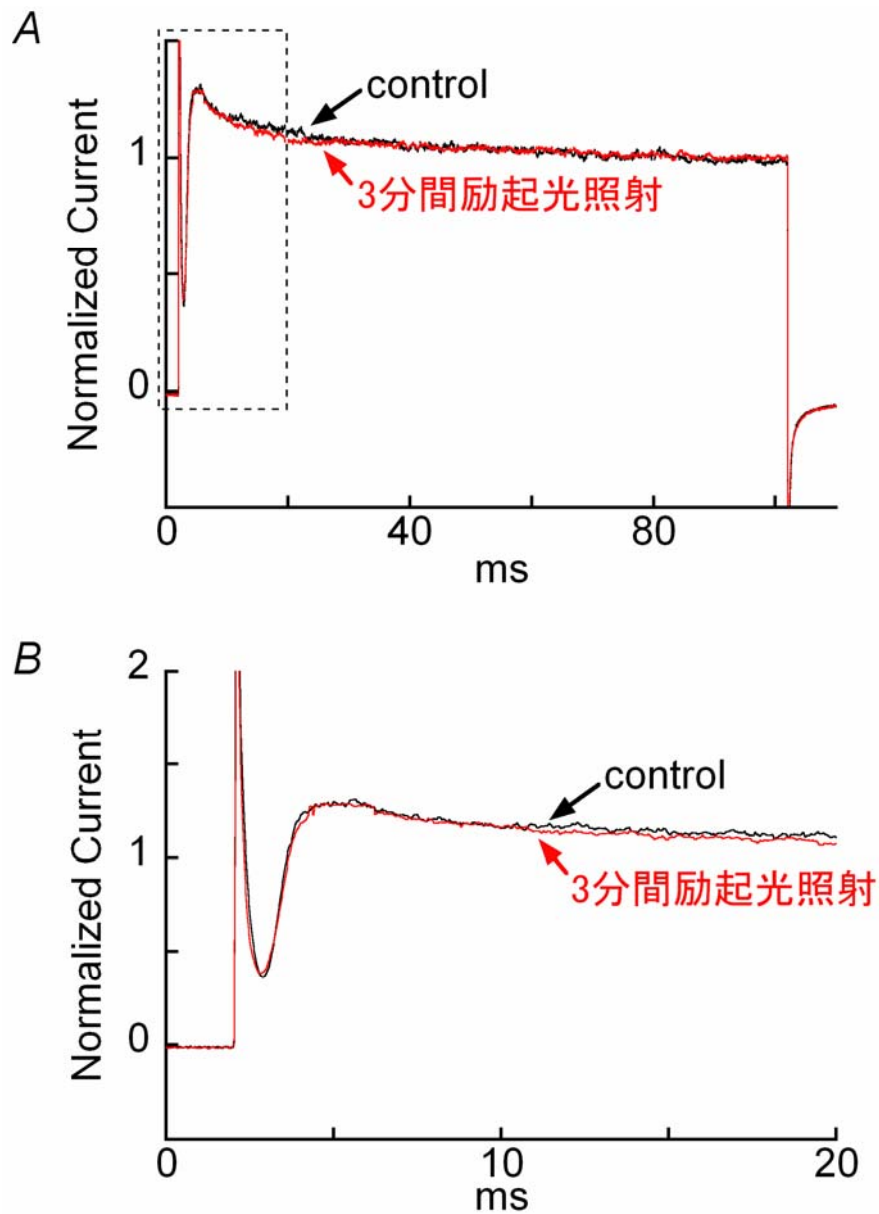


図 2-12 培養海馬神経細胞のTEA感受性・外向き整流性K⁺チャネル電流の活性化、不活性化に対するLYの作用

A, 定常状態電流（刺激電位に固定開始後 80 ms-85 ms の平均値）に対して規格化した励起光照射前（control）と 3 分間励起光照射後電流の重ね合わせ。保持電位 -85 mV。刺激電位 65 mV。B, 図 A 中の点線部分の時間軸拡大した図。定常状態電流以外の電流もよく重なっている。A、B 共に LY-K グルコネート内液

b-1-2. 内向き整流性 K^+ チャネル

培養海馬神経細胞の内向き整流性 K^+ チャネル電流も、LYに対する励起光照射で増大した（図2-13）。3分間励起光照射により、内向き整流性 K^+ チャネル電流は、調べたすべての電位で増大した（図2-14A）。電流の増大は、励起光照射時間に依存していた（図2-13B）。

内向き整流性 K^+ 電流は、その逆転電位を K^+ の平衡電位(E_K)付近にもち、 E_K より過分極側ではつきりと漏れ電流より増大する。言い換えると、内向き整流性 K^+ チャネル電流が観測できた電位が E_K 、および逆転電位と見なせる。LYに対する励起光照射は、逆転電位を変化させなかったことから、チャネルのイオン選択性を変化させないことがわかった。また、励起光照射の前後で内向き整流性 K^+ 電流の傾きがいずれも直線であることから、励起されたLYは、内向き整流性 K^+ チャネルの電位依存性を変化させないことがわかった（図2-14A）。励起光照射後のチャネルコンダクタンスは、励起光照射前のコンダクタンスの1.8倍であった（図2-14B）。

内向き整流性電流は、早い活性化過程と遅い不活性化過程を持っていた（図2-13）。励起光照射前と3分間励起光照射後の電流を規格化し、活性化過程および不活性化過程を比較した（図2-15）。励起光照射前後の電流がよく重なり合うことから、LYの作用は、活性化や不活性化の過程を変化させないと結論した。

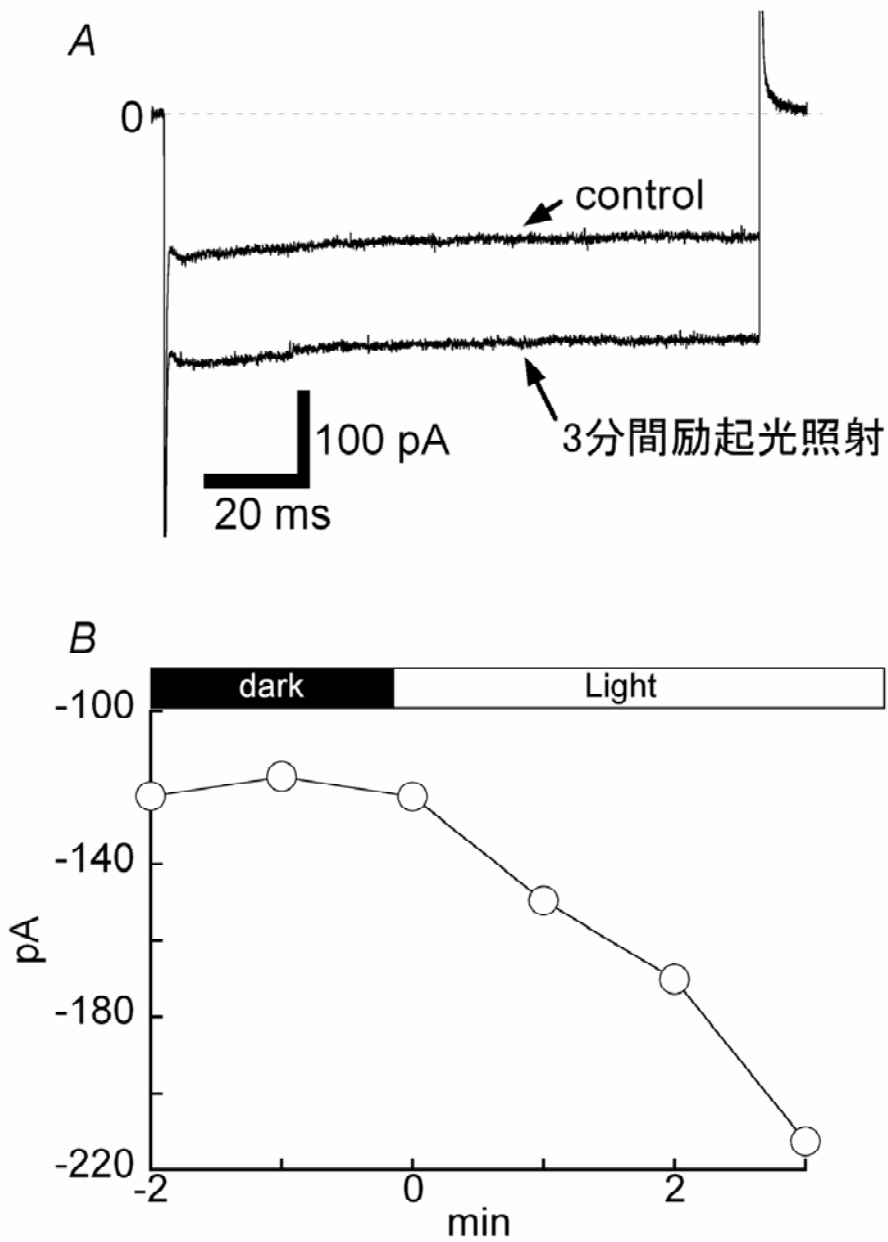


図 2-13 培養海馬神経細胞の内向き整流性 K^+ チャンネル電流に対するLYの作用

A, 刺激電位 -135 mV。保持電位 -85 mV。B, Aで示した細胞の励起光照射時間依存性。励起光を照射し始めた時間を0としている。刺激電位、 -135 mV。保持電位、 -85 mV。定常状態電流（刺激電位に固定開始後 80 ms-85 msの平均値）をプロット。LY-K グルコネート内液。

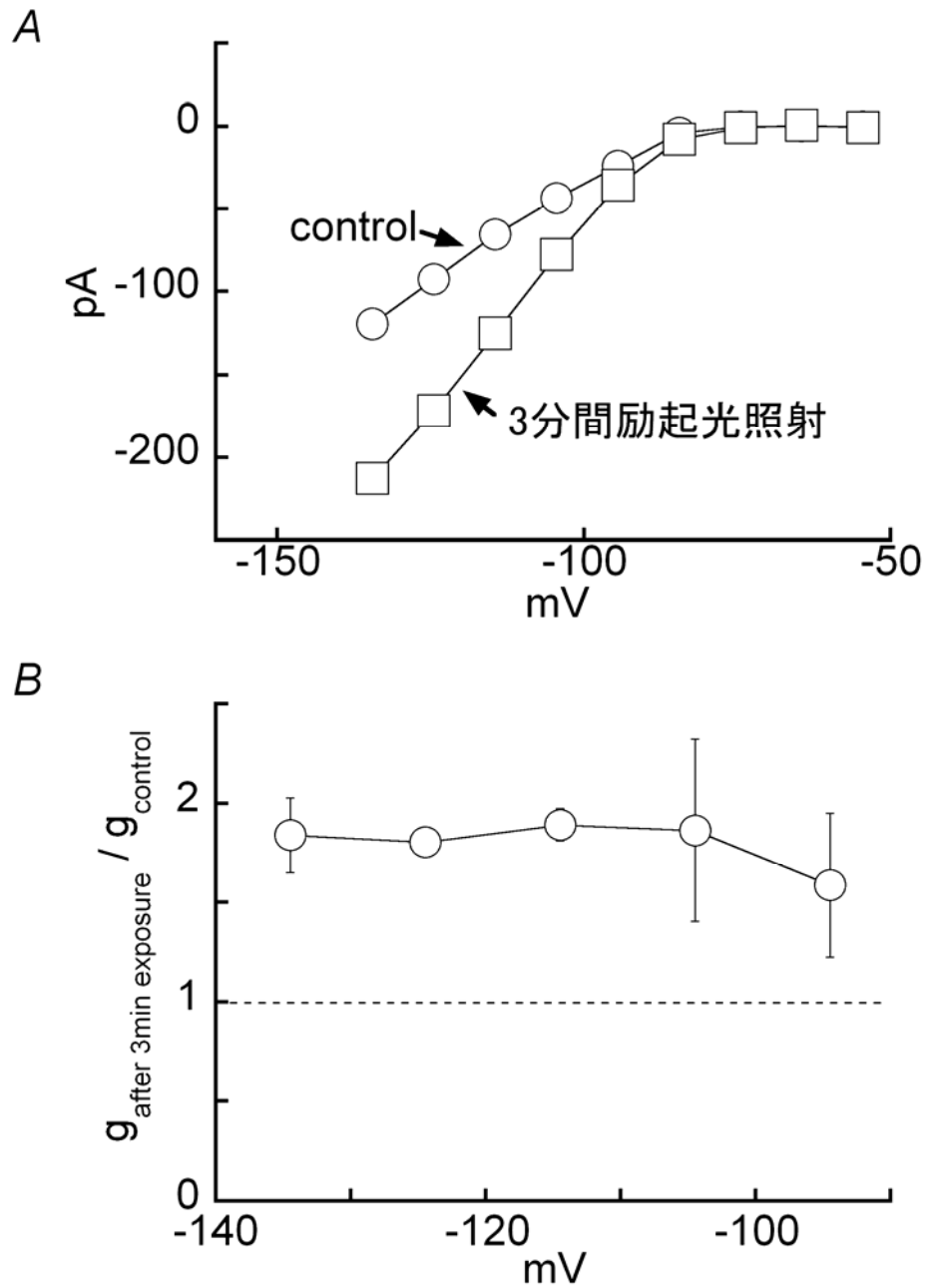


図 2-14 培養海馬神経細胞の内向き整流性 K^+ チャネル電流に対するLY作用の電位依存性

電流電圧曲線 (A) も、コンダクタンスの電位依存性 (B) も図 2-11 と同様に作成。プロットしたデータは 3 細胞の平均値と標準偏差を示す。

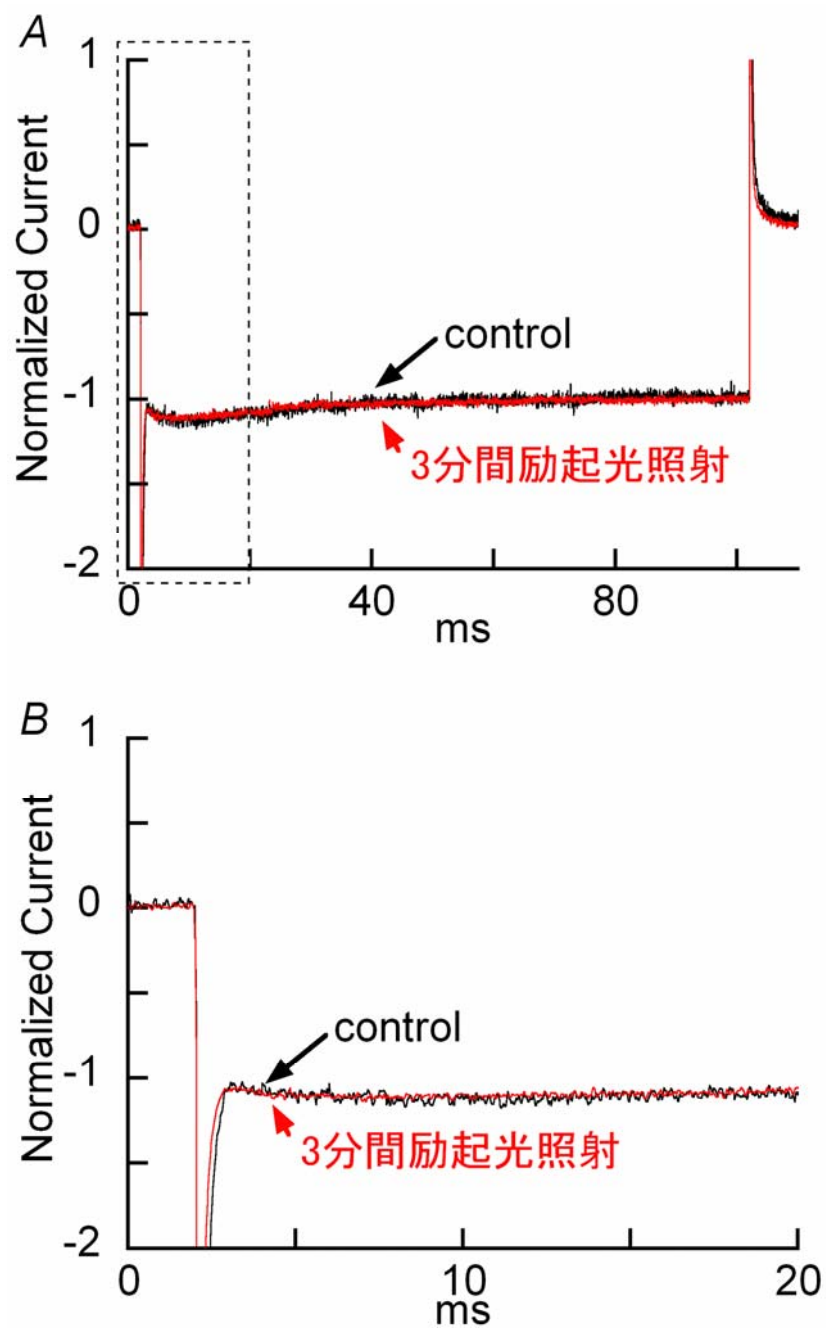


図 2-15 培養海馬神経細胞の内向き整流性K⁺チャンネル電流の活性化に対するLYの作用

図 2-12 と同様に重ね合わせた電流。保持電位 -85 mV。刺激電位 -135 mV。
LY-K グルコネート内液。定常状態に達する前の電流もよく重なっている。

b-2. Cl⁻チャネル

味蕾細胞の外向き電流は、TEA非感受性の電位依存性Cl⁻チャネル電流を含んでいる (Noguchi et al., 2003)。Cl⁻電流に対するLYの作用を測定した (図2-16)。

まず、味蕾細胞の細胞外液にTEAを加えると、外向き電流の一部が抑制できた。さらにTEAを含む細胞外液中で、3分間励起光を味蕾細胞に照射したが電流に変化は無かった。励起光照射後、Cl⁻をメタンスルホン酸で置換したTEAを含む細胞外液を与えると、外向き電流のほとんどを抑制できた。したがってTEAで抑制できなかった電流は、電位依存性Cl⁻電流であり、LYは、電位依存性Cl⁻電流に作用を示さないことがわかった。

b-3. HVA-Ca²⁺チャネル

電位依存性Ca²⁺チャネルは、開口に大きな脱分極を必要とする high-voltage-activated Ca²⁺チャネル (HVA-Ca²⁺チャネル) と小さな脱分極でも開口できる low-voltage-activated Ca²⁺チャネル (LVA-Ca²⁺チャネル) に分類される。私は、培養海馬神経細胞で測定することが容易であるHVA-Ca²⁺チャネル電流について調べた。HVA-Ca²⁺チャネルは、Ca²⁺よりもBa²⁺の方がチャネルのイオン透過性が高い。そこで、HVA-Ca²⁺電流は、Ba²⁺電流として測定した。HVA-Ca²⁺チャネル電流は、ホールセルパッチクランプ法によって細胞内の環境が変化すると開きにくくなる (rundown) ため、一定の割合で経時的に減少する (図2-17)。LYがHVA-Ca²⁺チャネル電流に作用を示すならば、励起光を細胞に照射することで、rundownしながらも電流の減少あるいは増大が測定できると考え実験を行った。培養海馬神経細胞のBa²⁺電流は、暗黒下、励起光照射下に関係なく常に一定の割合で減少し続けたことから、LYは、Ba²⁺電流に作用を示さないと結論した。

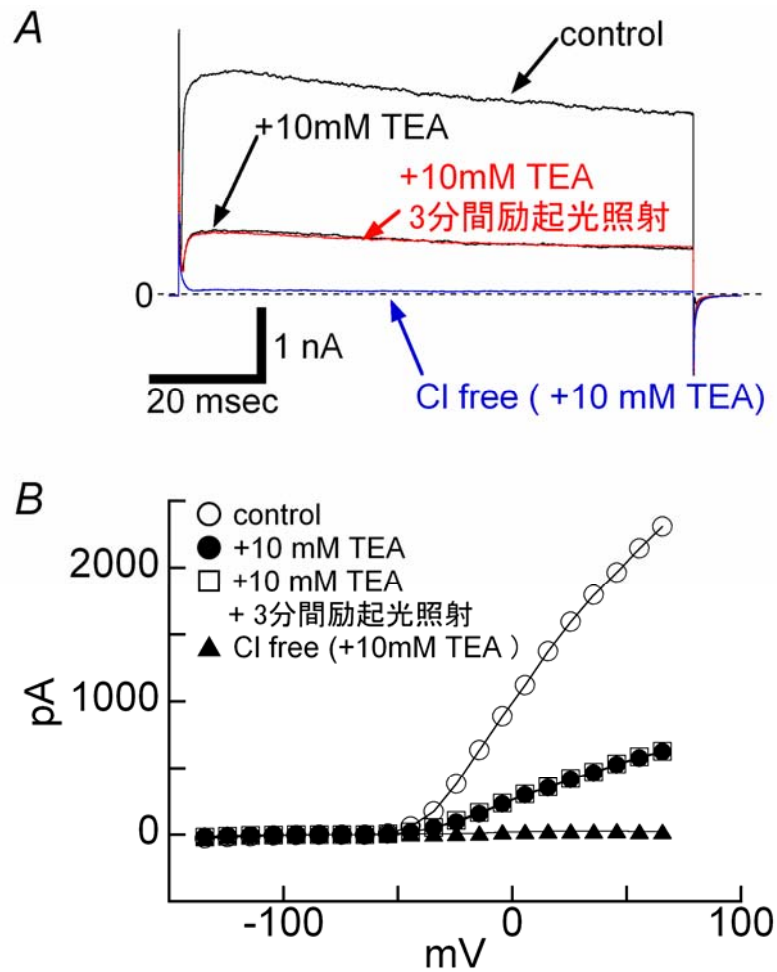


図 2-16 味蕾細胞電位依存性 Cl チャンネル電流に対する LY の作用

A, control; 通常細胞外液中で測定した外向き電流。+10 mM TEA; TEA 非感受性電流。+10 mM TEA 3 分間励起光照射; 3 分間励起光照射後、測定した TEA 非感受性電流。Cl free (+10 mM TEA); 10 mM TEA を含む Cl free 細胞外液中で測定した電流(リーク電流)。“control”、“+10 mM TEA”、“+10 mM TEA 3 分間励起光照射”、“Cl free(+10 mM TEA)” の順に測定した。TEA 非感受性電流は、3 分間励起光照射後も変化していない。励起光照射後、Cl をメタンスルホン酸で置換した、TEA を含む細胞外液 (10 mM TEA を含む Cl free 細胞外液) を灌流すると TEA 非感受性電流がほとんど消失することから、励起された LY が作用しないこの電流は Cl 電流であることがわかる。保持電位 -85 mV。刺激電位 +65 mV。B, A で示した電流の電流電圧曲線。定常状態 (刺激電位に固定後、80 ms から 85 ms) の平均値をプロットしている。○; control。●; TEA 非感受性電流。□; 3 分間励起光照射後の TEA 非感受性電流。▲; 10 mM TEA を含む Cl free 細胞外液中で測定した電流 (リーク電流)。LY-K グルコネート内液。

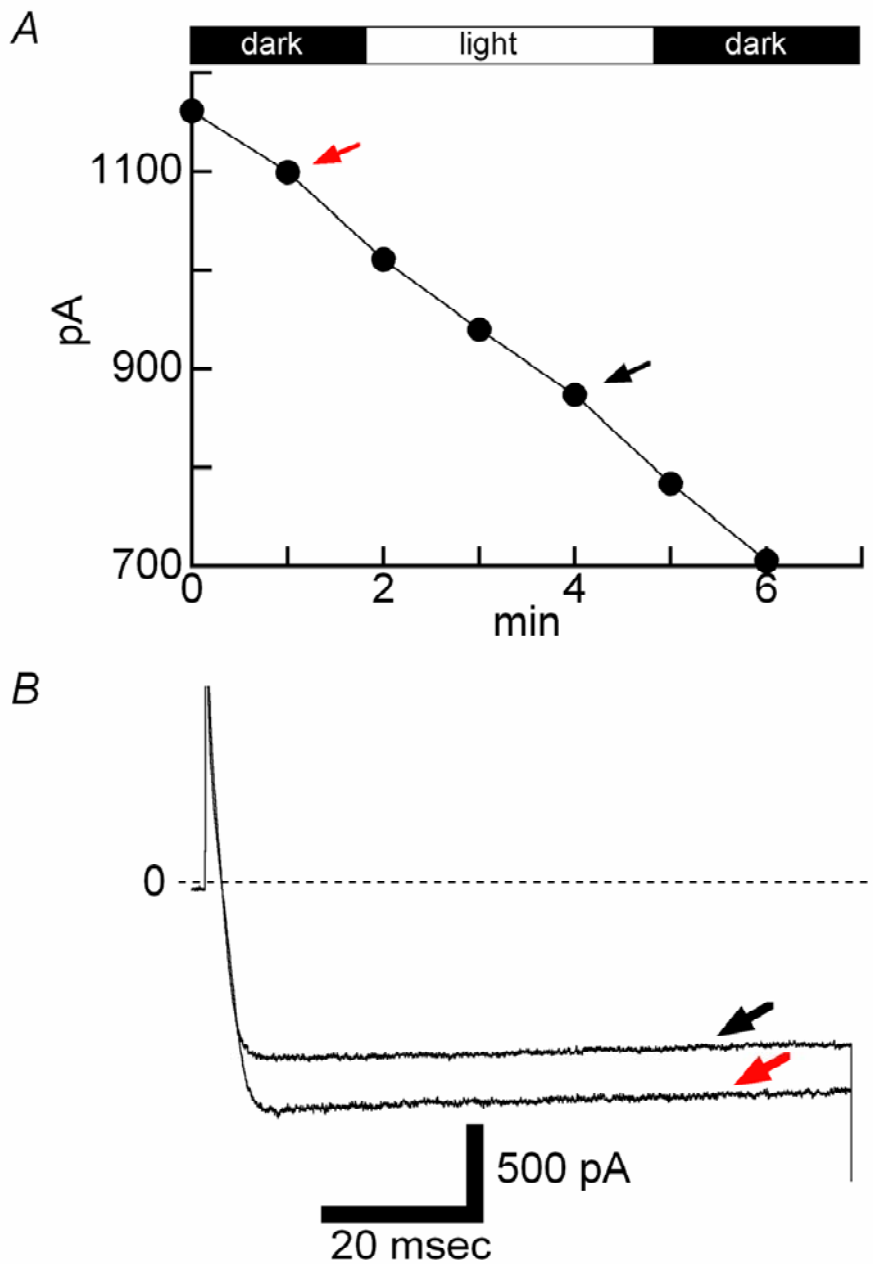


図 2-17 培養海馬神経細胞のHVA-Ca²⁺チャンネル電流に対するLYの作用

A, HVA-Ca²⁺電流の経時変化。時間に対して、定常状態電流（刺激電位に固定後 80 msから 85 msの平均値）をプロットしている。図中の矢印で示した電流をBに示す。B, HVA-Ca²⁺電流。各色の矢印は、図Aの矢印と対応している。保持電位-85 mV。刺激電位-5 mV。第II章において、この図および以下の図の電極内液は、すべてLY-Cs内液。

c. 神経伝達物質受容体チャネル

c-1. イオンチャネル型グルタミン酸受容体チャネル

c-1-1. AMPA 受容体チャネル

培養海馬神経細胞をホールセルパッチクランプ法によって電位固定し、5 μM AMPAで刺激すると一過的な内向き電流に続いて持続的な内向き電流が発生した。つまり、AMPA応答は、不活性化過程をもつ電流と持続的な電流を含んでいた（図2-18）。一過性電流は、繰り返し刺激によって減少すること、AMPA濃度が一定になる前に不活性化を始めることなど電流変化の定量化が困難であった。そこで、持続的な電流に注目しLYの作用を調べた。

持続性AMPA応答は、励起光照射時間の増加に伴い、増大した。4分間励起光照射で、持続的な内向き電流は、励起光照射前と比べて、3.9倍増大した。

次に、チャネルのイオン選択性を調べた（図2-19）。励起光を照射する前と励起光を5分間照射した後に、AMPA刺激を行い、持続性応答生成中に電流-電圧曲線を測定し、逆転電位を調べた。励起光を照射前と後の逆転電位は、それぞれ-8mV、-5mVとなり、ほとんど変化しなかった。したがって、LYは、AMPA受容体チャネルのイオン選択性を変えないことがわかった。

c-1-2. カイニン酸受容体チャネル

培養海馬神経細胞をホールセルクランプ法で電位固定し、20 μM カイニン酸溶液で刺激すると、持続的な内向き電流が発生した（図2-20）。この細胞に対して励起光を照射し、刺激によって発生する発生する内向き電流の大きさを照射前、照射後で比較した。持続的な内向き電流は、繰り返し刺激することによってわずかではあるが減少した。このわずかな減少の傾向は、励起光照射前と後に関わらず一定であったことから、LYは、カイニン酸受容体に作用しないことがわかった。

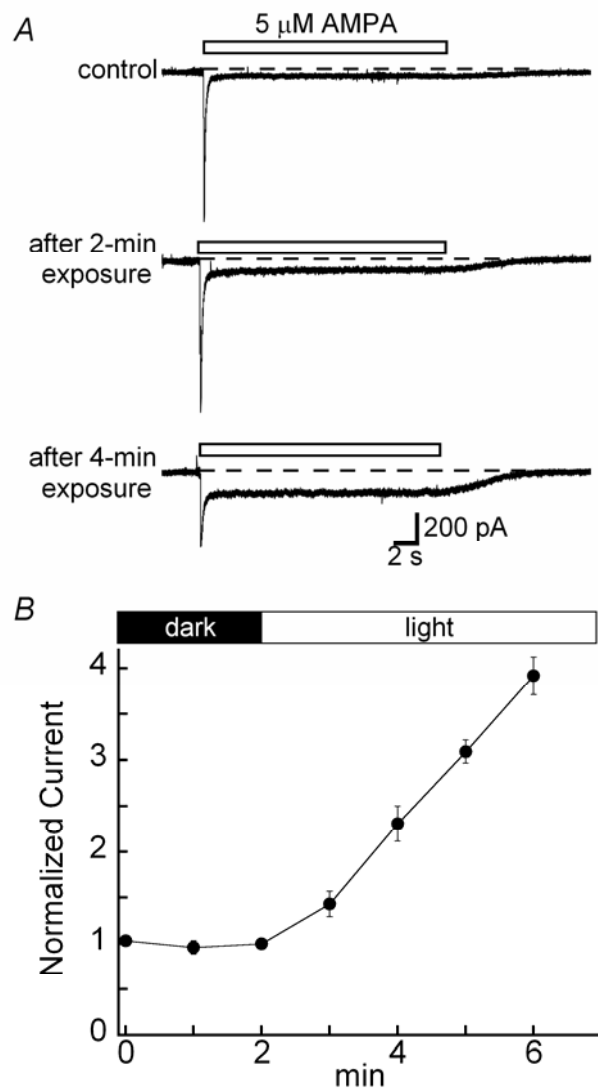


図 2-18 培養海馬神経細胞の AMPA 受容体電流に対する LY の作用

A, AMPA (5 μ M)に対する電流応答。control; 励起光照射前の AMPA 応答。after 2-min exposure ; 2 分間励起光照射後の AMPA 応答。after 4-min exposure ; 4 分間励起光照射後の AMPA 応答。白抜きバーは、刺激時間。保持電位 -70 mV。B, AMPA 応答の励起光照射時間依存性。AMPA を 1 分ごとに 20 秒間与え、AMPA 応答の定常値 (刺激開始後 5 秒-18 秒の平均値) を励起光照射 2 分前に測定した AMPA 応答定常値に対して規格化している。プロットしたデータは、3 細胞から得た応答の平均値と標準偏差。

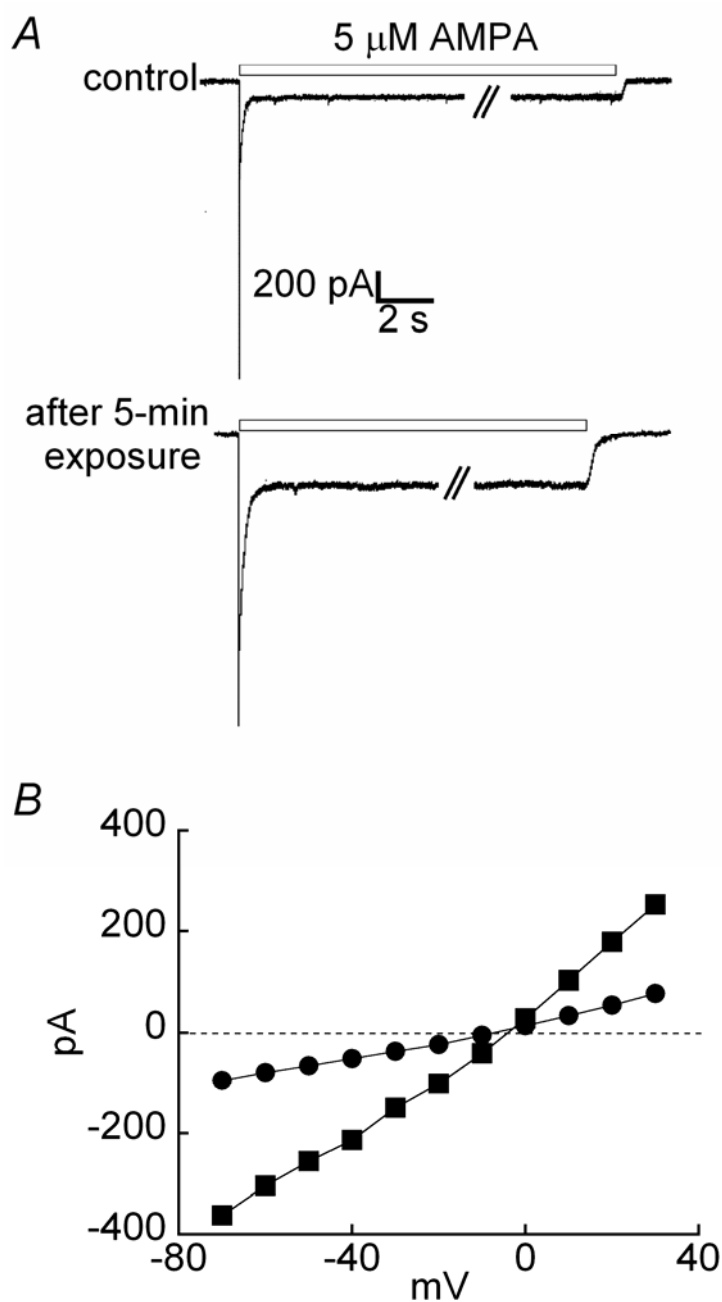


図 2-19 培養海馬神経細胞 AMPA 受容体電流の逆転電位に対する LY の作用

A, 励起光照射前(control)と 5 分間励起光照射後 (after-5-min exposure)の AMPA 電流応答。保持電位 -70 mV。刺激中、電流非表示部分で逆転電位を求めするために電位パルスを与えた。B, A で示した AMPA 応答の持続性応答生成時に測定した電流電圧曲線 (各電位に固定後、10ms から 40 ms の平均値で作成)。

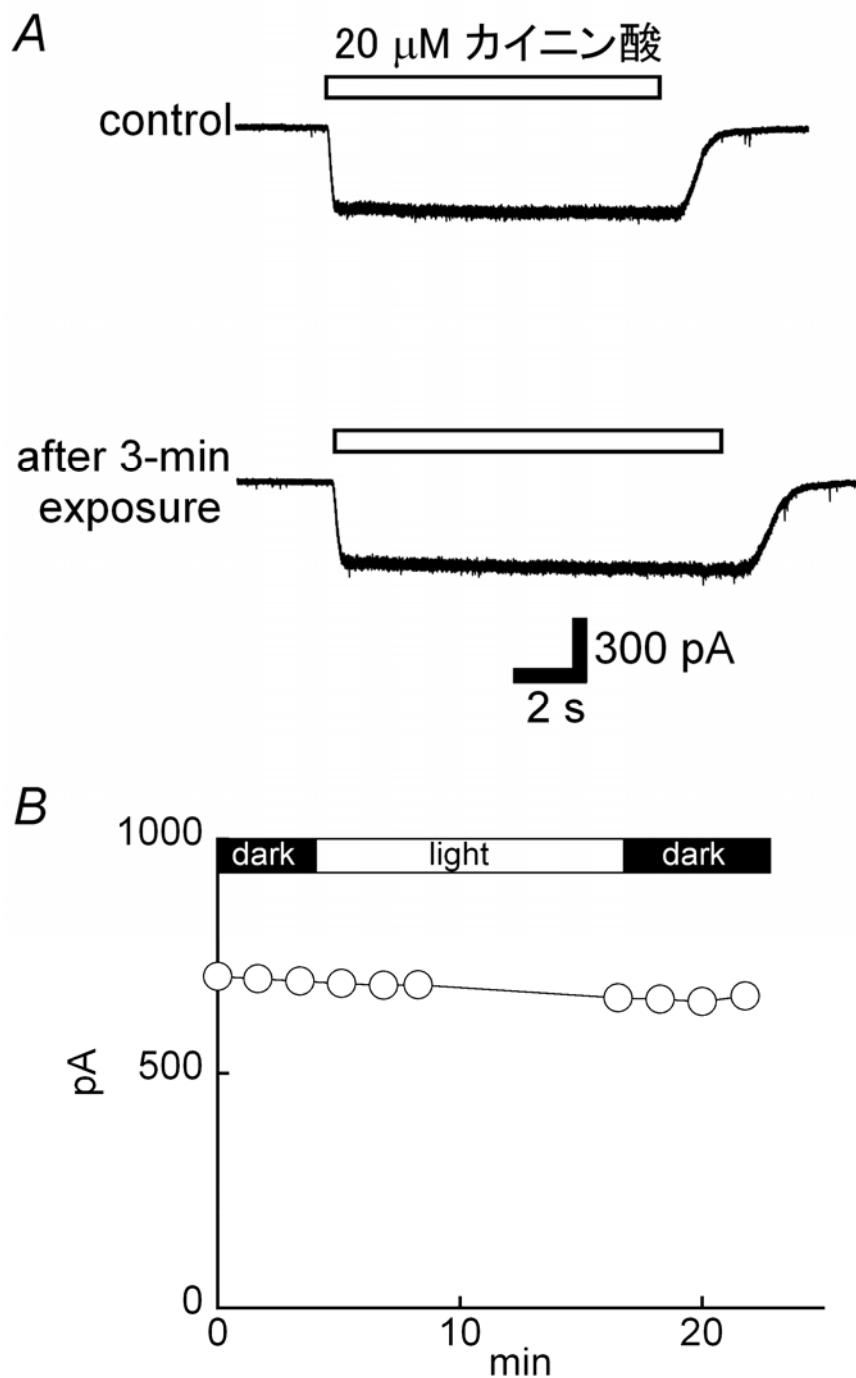


図 2-20 培養海馬神経細胞カイニン酸受容体電流に対する LY の作用

A, カイニン酸 20 μ M 刺激に対する電流応答。励起光照射前 (control) と 3 分間励起光照射後 (after 3-min exposure) の電流応答。保持電位 -70 mV。B, カイニン酸受容体電流の励起光照射時間依存性。カイニン酸応答の定常値 (刺激開始後、5 秒から 18 秒の平均値) を時間に対してプロットしている。

c-1-3. NMDA 受容体チャネル

NMDA受容体は、NMDAとグリシンを同時に与えると開くチャネルである。したがって、本研究では常に1 μM グリシンをNMDAに共存させた。培養海馬神経細胞をホールセルクランプ法で電位固定し、30 μM NMDA溶液で刺激すると、一過的な内向き電流に続いて持続的な内向き電流が発生した（図2-21）。一過性電流は、繰り返し刺激により変化したため、LYの作用を調べるには不適當であった。持続的な内向き電流も、繰り返し刺激することによってわずかではあるが減少した。しかし、励起光照射前と後に関わらず持続的な内向き電流の減少がほぼ一定であったことから、LYは、NMDA受容体電流に作用しないことがわかった。

c-2. イオンチャネル型セロトニン受容体チャネル

標本には、セロトニン受容体サブタイプ5HT₃を発現している培養細胞N1E-115を用いた。N1E-115 細胞をホールセルクランプ法で電位固定し、10 μM セロトニンで刺激すると不活性化する内向き電流が発生した（図2-22）。この細胞に対して、励起光を最大7分間照射し、照射前、照射後で、それぞれの電流のピーク値と刺激1秒後の値を測定し、比較した。ピーク電流と刺激1秒後の電流は、繰り返し刺激をすることによって減少した。セロトニン受容体電流は、励起光照射前と後に関わらず、一定の大きさで内向き電流が減少したことから、LYは、セロトニン受容体電流に対して作用しないことがわかった。

c-3. GABA_A受容体チャネル

GABA受容体チャネルには、イオンチャネル型(GABA_A)、代謝型(GABA_B)の二種類のチャネルがある。GABA刺激によって発生した電流がどちらのタイプによるものか区別するためイオンチャネル型のブロッカーであるbicucullineを用いた。培養海馬神経細胞をホールセルクランプ法で電位固定し、10 μM GABAで刺激すると、一過的な内向き電流と持続的な内向き電流が発生した（図2-23）。一過的な内向き電流、持続的な内向き電流は、ともに繰り返し刺激によって減少した。内向き電流を確認した後、GABA刺激と同時に30 μM bicucullineで刺激すると一過的な内向き電流も持続的な内向き電流も発生しなかった。したがって、この神経細胞のGABA受容体電流は、すべてイオンチャネル型、GABA_A受容体電流であることを確認した。

この細胞に、励起光を5分間照射し、GABAで刺激すると、一過的、持続的内向き電流を発生した。しかし、励起光照射前と後に関わらず一過的、持続的内向き電流は、一定の大きさを減少した。したがって、LYは、GABA_A受容体電流に作用しないことがわかった。

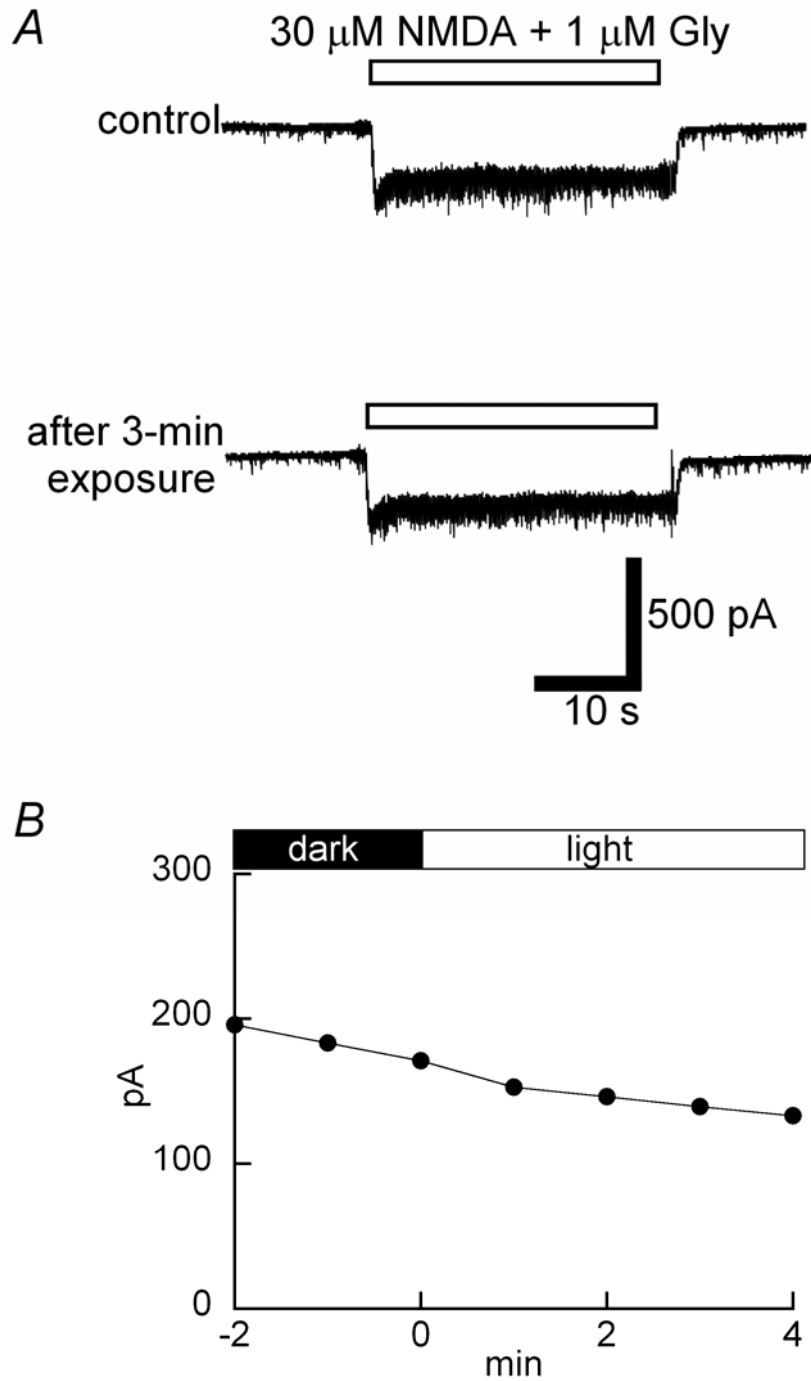


図 2-21 培養海馬神経細胞 NMDA 受容体電流に対する LY の作用

A, NMDA 刺激 (30 μ M NMDA + 1 μ M グリシン) に対する電流応答。励起光照射前(control)と 3 分間励起光照射後 (after 3-min exposure) の電流応答。保持電位 -70 mV。B, NMDA 受容体電流の励起光照射時間依存性。NMDA 応答の定常値 (刺激開始後、20 秒から 30 秒の平均値) を時間に対してプロットしている。

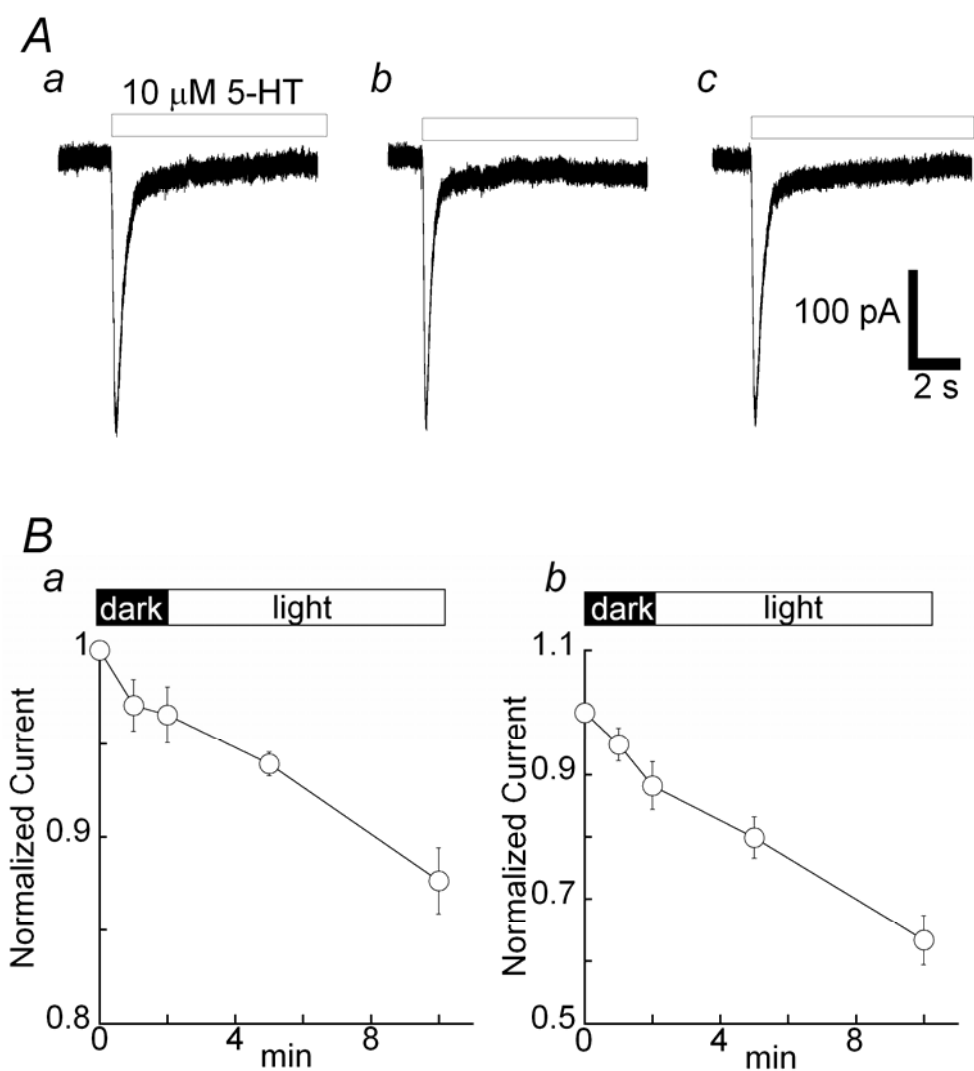


図 2-22 N1E-115 細胞 5-HT₃受容体電流に対するLYの作用

A, 5-HT₃ (10 μM) に対する電流応答。a, 励起光照射前の 5-HT₃受容体電流 (control)。b, 3 分間励起光照射後の電流 (after 3-min exposure)。c, 7 分間励起光照射後の電流 (after 7-min exposure)。白抜きのバーは、刺激時間。保持電位 -70 mV。B, 5-HT₃受容体電流の励起光照射時間依存性。a, 測定開始直後 (0 min) の 5-HT₃電流ピーク値に対し規格化した各電流応答のピーク値。b, 同様に規格化した刺激 1 秒後の各電流応答。プロットしたデータは 3 細胞から得た応答の平均値と標準偏差。

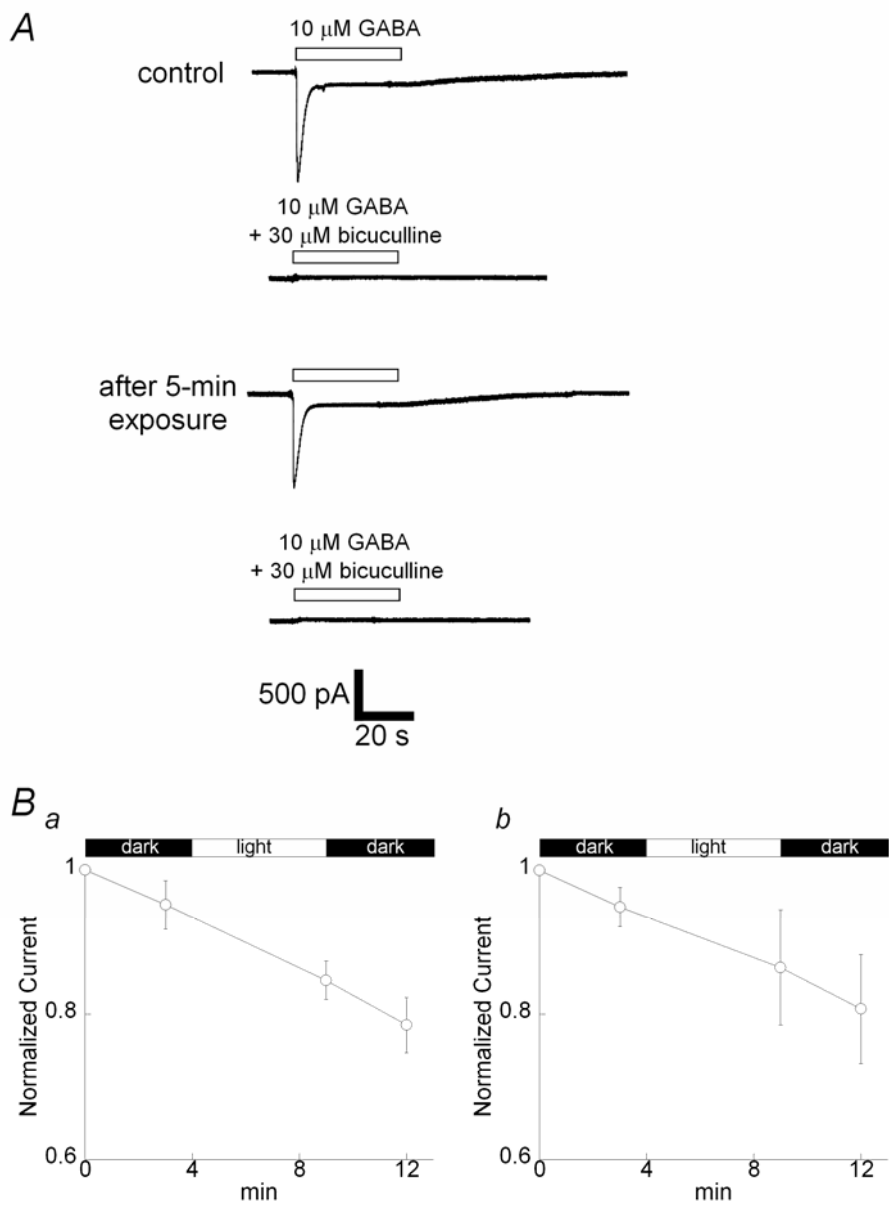


図 2-23 培養海馬神経細胞GABA_A受容体電流に対するLYの作用

A, 励起光照射前の電流応答 (control) と 5 分間励起光照射後 (after 5-min exposure) の 10 μ M GABA 刺激に対する電流応答。GABA_A 受容体ブロッカーである 30 μ M bicuculline 存在下では、電流応答が発生しない。保持電位 -70 mV。B, GABA_A 受容体電流の励起光照射時間依存性。a, 測定開始直後 (0 min) の GABA_A 受容体電流ピーク値に対し規格化した各電流応答のピーク値。b, GABA 応答の定常値 (刺激開始後 15 秒から 30 秒の平均値) を測定開始直後 (0 min) の GABA 応答定常値に対して規格化し、時間に対してプロット。プロットしたデータは、3 細胞から得た応答の平均値と標準偏差。

II-4. 考察

各種イオンチャネル電流に対するLYの作用

細胞内に注入したLYを励起すると、電位依存性Na⁺チャネル電流ばかりでなく (Higure et al., 2003)、TEA感受性・外向き整流性K⁺チャネル電流、内向き整流性K⁺チャネル電流、AMPA受容体電流の変化することがわかった。また、電位依存性Cl⁻チャネル電流、HVA-Ca²⁺チャネル電流、NMDA受容体チャネル、カイニン酸受容体チャネル、5-HT₃受容体チャネル、GABA_A受容体チャネルは、変化しないことがわかった。これらの結果は、励起されたLYにチャネルタンパク質選択性のあることを示唆する。励起されたLYに感受性を示した電位依存性チャネルや神経伝達物質受容体は、類似したアミノ酸配列を持つのもかもしれない。励起されたLYは、細胞内に注入された時だけ電位依存性Na⁺チャネル電流を修飾した (Higure et al., 2003) ことから、LY感受性部位は、他のLY感受性チャネルにおいても細胞内に面していると考えた。LY感受性イオンチャネルのアミノ酸配列の相同性を調べることで、LYの作用を受ける共通したアミノ酸配列を特定できるかも知れないと考えた。また、このアミノ酸配列は、LYの結合部位を形成するかも知れないと考えた。

現在、電位依存性Na⁺チャネルの不活性化を阻害する試薬として、Pronase (Armstrong et al., 1973)、N-Bromoacetamide (Oxford et al., 1978)、Sea anemone (Narahashi et al., 1969)、 α -Scorpion toxins (Koppenhofer and Schmidt, 1968a,b) そして、Goniopora toxin (Muramatsu et al., 1985) 等が報告されている。また、K⁺チャネルを選択的に開くことで電流を増加する試薬としてnicarandil、pinacidil (Hamilton and Weston, 1989) 等が、AMPA受容体応答の速い不活性化をブロックする試薬としてcyclothazide (Partin et al., 1993) 等が報告されている。しかし、LYがこれらチャネルの機能を修飾することは知られていなかった。

励起光照射3分間によって、LYは、TEA感受性・外向き整流性K⁺チャネル電流を1.3倍に (図2-11)、内向き整流性K⁺チャネル電流を1.8倍に (図2-14)、定常状態におけるAMPA受容体チャネル電流を2.9倍に増大した (図2-18)。AMPA受容体チャネル電流に対するLY作用は、TEA・外向き整流性K⁺チャネル電流、内向き整流性K⁺チャネル電流に対する作用より大きかった。これらの結果から、LY作用に対する感受性は、チャネルによっ

で異なることがわかった。イオンチャネルには、多くのサブタイプが存在する。LY感受性は、サブタイプ間でも異なると思われた。

二種の電位依存性 K^+ チャネル電流は、明瞭な不活性化過程を持たなかった。しかし、LY作用によってこれらの電流は増大した（図2-12、15）。これは、電位依存性 Na^+ チャネル電流において、LY作用が不活性化を遅延したという結果と異なる。電位依存性 K^+ チャネル電流の増大という結果は、不活性化過程決定部位だけがLY作用の標的ではないことを示唆する。

単一イオンチャネルの研究方法としては、単一チャネル電流解析法とチャネル電流ノイズ解析法がある。片山は、LYの電位依存性 Na^+ チャネル不活性化遅延作用を単一チャネル電流解析法を用いて調べた（Higure et al., 2003）。その結果、不活性化の遅延は、 Na^+ チャネルの平均開口時間を延ばすことによって生じることがわかった。私もAMPA受容体の不活性化遅延作用において、同様に単一AMPA受容体チャネル電流を解析しようとして、単一チャネル電流の記録に挑んだが測定できなかった。

そこで、チャネル電流ノイズ解析法を用いて、ホールセル電流から単一チャネルの情報を得ることを試みた。AMPA受容体チャネルをノイズ解析法で調べるためには、LYを注入した同一の神経細胞から、異なるAMPA濃度に対する電流を励起光照射前、励起光照射後でそれぞれ記録する必要がある。これらの記録から得られた分散と平均電流の関係から、AMPA受容体チャネルの総数、シングルチャネルコンダクタンス、また、スペクトル解析から平均開口時間を推測することができる。LYを注入した細胞は、光照射下で容易に死ぬ傾向があった。そのためか、励起光照射後、異なるAMPA濃度に対する応答測定中に細胞が死んでしまい、分散と平均電流の関係を得ることができなかった。高濃度AMPA刺激がLYの傷害を促進すると考え、低濃度AMPA刺激に対する応答電流から、チャネルノイズを測定することにした。しかし、得られた単一チャネルコンダクタンス、平均開口時間には、励起光照射による変化を確認できなかった。

ノイズ解析に成功していれば、AMPA受容体チャネルの平均開口時間のLY依存性を明らかにし、LY作用の共通性を論じることができた。ノイズ解析は、将来自分が新たな実験を行い、困難な問題を解決するための手段のひとつとして利用できると思われた。

LYが引き起こすアーティファクト

LYの使用が始まった頃は、ガラス微小電極を細胞膜に刺入し、膜電位を測定していた。細胞を損傷させないため、ガラス微小電極の先端は、きわめて小さかった。このため、LYの細胞内への受動的拡散は無視できた。すなわち、LYの薬理作用を調べる必要がなかった。その後、パッチクランプ法が開発された。これは、直径2マイクロメートルのガラス電極を細胞に接着させた後、接着部分（パッチ）を破って、細胞の電気生理学的性質を測定するという方法である。細胞膜に対する損傷が少ないことから、現在汎用されている。しかし、開口部が巨大であるため、電極内液は、容易に細胞内に拡散してしまう。当然、電極内液に加えたLYが測定中に細胞内に拡散してしまう。しかし、これまで多くの研究者は、LYの薬理作用に気づかなかった。本研究は、これまでに発表された多く研究報告の中には、追試の必要があるものも含まれていることを示唆する。このように、本研究はパッチクランプ法利用者への警鐘となると考えた。

LYの作用を積極的に利用することで、LYを味蕾細胞ネットワークの研究に応用できると考えた。現在、味蕾細胞基底膜は、エピネフリン受容体 (Herness et al., 2002)、セロトニン受容体 (Kim and Roper., 1995; Kaya et al., 2004)、グルタミン酸受容体 (Caicedo et al., 2000)、アセチルコリン受容体 (Ogura, 2002)、ATP受容体 (Kim et al., 2000) などを発現していることが知られている。しかし、これらに対応する神経伝達物質がどこから放出されているかということは、まだ明らかにされていない。味蕾細胞が放出する神経伝達物質が同定できていないのは、放出量の低さによると考えられる。励起されたLYは、活動電位の持続時間を増大させた (図2-9)。この細胞が電位依存性Ca²⁺チャンネルを持つ場合、味刺激によって発生した活動電位がLY作用によって延長されるため、神経伝達物質の放出量を増大させることが可能になる。神経伝達物質を同定する方法として、sniffer-patch^[9]と呼ばれる方法がある。候補となる伝達物質の受容体を持つ細胞からOutside-outパッチ膜を作製し、神経伝達物質を放出する細胞に接近させ、電氣的応答を測定することで、放出された物質を同定するという方法である。細胞内にLYを注入し、励起光照射することで神経伝達物質の放出量を増大させると、sniffer-patchによる検出が容易になり、味蕾細胞が放出する神経伝達物質を同定できると考えた。

Ⅲ．修飾作用のメカニズム

III-1. 序論

第II章では、露光されたLYは、電位依存性Na⁺チャンネル、TEA感受性・外向き整流性K⁺チャンネル、内向き整流性K⁺チャンネル、AMPA受容体チャンネルに作用し、機能に傷害を与えることを明らかにした。露光されたLYは、活性酸素種を生成し、チャンネルを修飾している可能性がある。私は、活性酸素種を消去する物質、ジチオスレイトール (DTT) を用いてこの可能性を検証し、電位依存性Na⁺チャンネル電流に対するLY作用が励起光照射によって生じる活性酸素種によるものであることを突き止めた (Higure et al., 2003)。しかし、LY作用を引き起こす活性酸素種の同定には至らなかった。本章では、まず、Higureらの報告の中で私が担当した部分、すなわち、電位依存性Na⁺チャンネル電流に対するLY作用を引き起こす物質が活性酸素種であると明らかにしたこと、を示す。次に、スーパーオキサイドがLY作用に重要な役割を果たす活性酸素種であることを示す。

食べ物の持つエネルギーを利用できる形のエネルギーに変換するために、私たちは、酸素を必要とする。しかし、この好氣的エネルギー代謝においては、副産物として、スーパーオキサイドをはじめとする一群の活性酸素種が生成する。活性酸素種は、その化学的反応性の高さから、生体に酸化ストレスをもたらすことが知られている。老化 (Beckman and Ames, 1998; Alexeyev et al., 2004; Hussain and Mitra, 2004)、発癌 (Oberley and Buettner, 1979; Totter, 1980)、炎症 (McCord, 1974; Guzik et al., 2003) など、さまざまな疾患病態に活性酸素の関与することがセントラルドグマとして広く受け入れられている。

生体内には活性酸素に対する防御系も、存在している。スーパーオキサイドジスムターゼ (SOD) は、スーパーオキサイドを特異的に消去する酵素である。SODは、細胞質内に存在し、1原子のCuとZnを持つ、Cu/Zn-SOD (McCord and Fridovich, 1969)、ミトコンドリア内に存在し、1原子のMnを持つ、Mn-SOD (Weisiger and Fridovich, 1973)、細胞外へ分泌されるExtracellular-SOD (Marklund et al., 1982) の三種がある。このように、SODは、細胞内外に渡って分布し、スーパーオキサイドの毒性から細胞を守っている。

LYの作用がスーパーオキサイドと関連があるのならば、生体に備わっているスーパーオキサイド防御系を利用することで、LY作用を引き起こす活性酸素を知ることができるのではないのだろうか。私は、この生体のスー

パーオキシサイド防御系に注目し、LY作用を引き起こす活性酸素種の同定を行った。

III-2. 材料および方法

a. 剥離舌上皮標本の調製

剥離舌上皮標本の調製は、第II章に記述した方法で行った。

b. 味蕾細胞の電気生理学的測定法

味蕾細胞の電気生理学的測定は、第II章に記述した方法で行った。

c. 照明

実験設備はすべて暗幕で覆い、私も暗幕の中で測定を行った。以下に述べるように、ギガオームシール作成後、LYの露光は、十分に制御した。L0~L2の三種類の照明で、LYを露光した。L0は、~1000 lxの実験室の照明を示す。用いたLY内液は、すべて、L0照明下で調整し、光を遮断した水箱の中に30分以上放置後、実験に用いた。30分間暗黒下に置くことで、調整時のL0露光で生成した活性酸素種は、そのほとんどが分解したと考えられる(結果参照)。LY内液は、20秒間のL0照明下で記録電極に詰め、水浸対物顕微鏡下にセットした。20秒以内にセットできても、L0で20秒間照射し続けた。

L1は、試料の下から上への照明で、顕微鏡のコンデンサー部を通過後の照度は5000 lxとした。L1で40秒間照明する間に、記録電極を味蕾細胞に近づけ、細胞膜に記録電極をギガオーム以上の高抵抗で密着(ギガオームシール)させた。40秒以内にギガオームシールを形成しても、L1で40秒間照射し続けた。その後、暗黒下で2分以内にwhole-cell clamp条件を達成した。すなわち、記録電極と細胞膜の密着領域(パッチ膜)を破り、正確な電位固定電流を得るためにシリーズレジスタンスと膜容量の補正を行った。暗黒下でのLY作用を調べるためのすべての実験において、電位固定電流測定開始までは、上記の操作を行った。

L2は、ダイクロイックミラー(U-MWIG, Olympus)で反射された試料の上から下への照明で、光源は5000 lxとした。L2は、正立顕微鏡においてLYを励起するために使われる通常の方法であり、第II章においてLYを励起するために用いた励起法と同一である。L2の照射時間は、実験によって調節した。

d. カーブフィット

不活性化の時定数 $\tau_{\text{inactivation}}$ およびNICの定量化は、第II章に記述した方法でおこなった。

$\tau_{\text{inactivation}}$ およびNMNIC減衰の時定数は、以下に示す式でカーブフィットを行った。

$$y = a + b \cdot \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) K \quad (3-1)$$

aは、定常状態の $\tau_{\text{inactivation}}$ およびNICを示す。bは、 $t = 0$ のときの $\tau_{\text{inactivation}}$ およびNMNICを示す。ここで τ は、 $\tau_{\text{inactivation}}$ およびNMNICの減衰の時定数を示す。

e. DTT処理

測定用プラットホームに基底膜側を上にして固定した舌上皮を10分間、1 mM DTT溶液で灌流した後、5分間、細胞外液で洗い、LYを細胞内に注入した。

LYのAMPA受容体電流増強作用に対するDTT処理の効果を調べるときは、応答を測定中に10分間、1 mM DTT溶液を灌流した。

f. 溶液

電気生理実験用溶液

細胞外液、 Cs^+ 内液、 K^+ グルコネート内液、LY内液の組成は、第II章（材料および方法（溶液））と同一とした。

DTT溶液は、使用直前にジチオスレイトール[Wako 047-08973]を1 mMになるように細胞外液に溶かして調製した。

新生牛血清 [Cosmobio 12181610]を添加したLY内液は、血清濃度が0.05 ml/mlになるように調製した。SOD[SIGMA S2515-75KU]を添加したLY内液は、SOD濃度が223.5 units/mlになるように調製した。牛血清濃度は、通常の血清培地に添加する濃度と同じになるように調整した。SOD濃度も通常の無血清培地に添加する濃度と同じになるように調整した。

g. 刺激溶液

TTX溶液、TEA溶液、AMPA溶液の組成は、第II章（材料および方法（溶液））と同一とした。

III-3. 結果

a. DTT処理の効果

励起されたLYの作用が光酸化反応によって生成された活性酸素によるものならば、活性酸素種を消失させる物質、フリーラジカルスカベンジャーを用いることでLY作用を阻害できるのではないかと考えた。そこで、代表的なフリーラジカルスカベンジャーであるDTT (1 mM) のLY作用に対する効果を調べた。

LYによる味蕾細胞の電位依存性Na⁺チャネルの不活性化の遅延は、DTT処理を行うことによって抑制できた(図3-1A)。LYがないとき、DTT処理は不活性化の時定数 $\tau_{inactivation}$ を変化させなかった。したがって、DTTは、電位依存性Na⁺チャネル電流に対して薬理作用を持たないことも分かった。LYを露光する前のNICに対して規格化したNIC (normalized magnitude of NIC; NMNIC) も、DTT処理を行うと抑制できた(図3-1B)。また、励起光を照射する前にすでに $\tau_{inactivation}$ およびNMNICが大きくなっていった(図3-1)。このような、暗黒下におけるLYの作用については、次のセクションで述べる。

培養海馬神経細胞のTEA感受性・外向き整流性K⁺チャネル電流に対するLY作用も、DTT処理により抑制できた(図3-2A)。調べたすべての電位に対して、DTT処理は、3分間励起光照射によって生じるはずのLY作用を抑制した。培養海馬神経細胞の内向き整流性K⁺チャネル電流に対するLY作用も、DTT処理によって同様に抑制できた(図3-2B)。

AMPA応答に対するDTTの作用は、方法に示したように、異なる方法で調べた。応答測定中にDTT溶液で培養海馬神経細胞を灌流するという方法で調べた。このDTT処理も、培養海馬神経細胞のAMPA受容体電流に対するLY作用を抑制した(図3-3)。DTT存在下では、励起光を照射しても、持続的内向き電流の大きさは、暗黒下と比べて変化が無かった。DTTを洗い流すと励起光照射時間に依存して持続的内向き電流が増大した。

これらの結果は、フリーラジカル化したLY、あるいは露光したLYが生成する活性酸素種がこれらのチャネルを修飾することを示唆する。

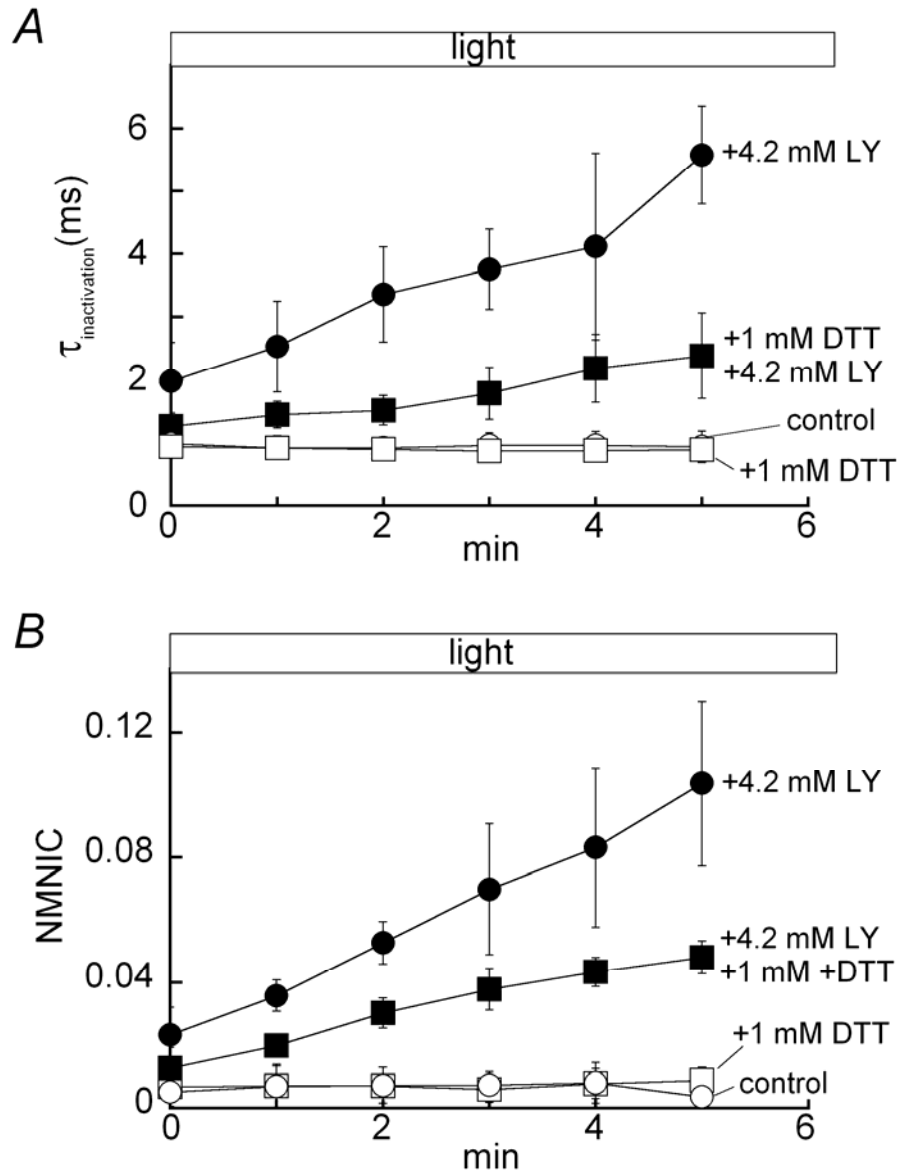


図 3-1 LYのNa⁺電流不活性化阻害作用に対するDTT処理の効果。

A, 味蕾細胞電位依存性Na⁺電流不活性化時定数 $\tau_{inactivation}$ の励起光照射時間依存性。B, LYを露光する前のピーク電流値に対して規格化した非不活性化電流値 (NMNIC) の励起光照射時間依存性。DTT (ジチオスレイトール、フリーラジカルスカベンジャー試薬) 処理をせずにLYを注入した細胞 (●)、DTT処理後にLYを注入した細胞 (■)、control (○)、およびDTT処理のみを行った細胞 (□) の $\tau_{inactivation}$ 。プロットしたデータは3細胞から得た応答の平均値と標準偏差。

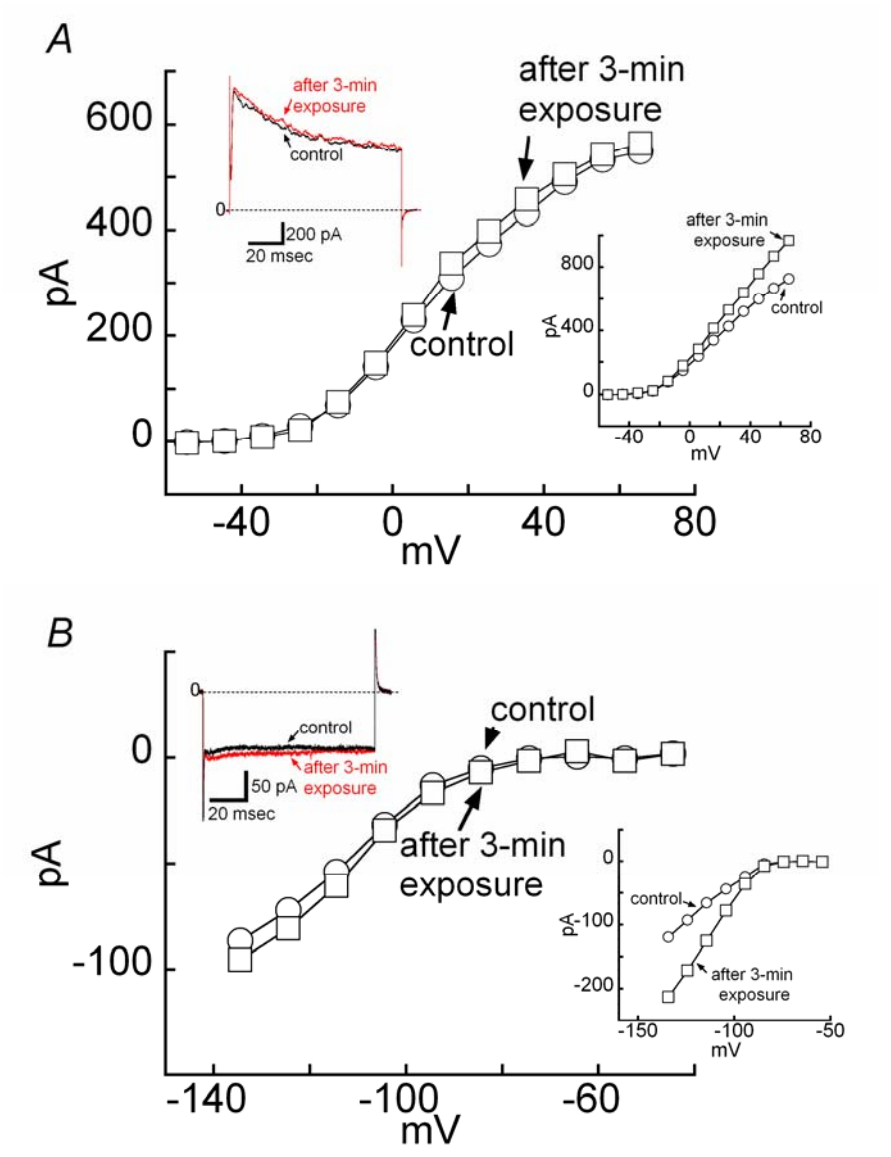


図 3-2 DTT処理した培養海馬神経細胞K⁺チャネル電流に対するLY作用

A, TEA感受性・外向き整流性K⁺チャネル電流の電位依存性。挿入図；左上；保持電位 (-85 mV) から刺激電位 (65 mV) へ固定電位を変化させたときの応答電流(control)と 3 分間励起光照射後の電流 (after 3-min exposure)。右下；DTT未処理のTEA感受性・外向き整流性K⁺電流の電流電圧曲線。LY-Kグルコネート内液。B,内向き整流性K⁺チャネル電流の電位依存性。Aと同様に作成している。挿入図；保持電位-85 mV。刺激電位-135 mV。control；励起光照射前。after 3-min exposure；3 分間励起光照射後。LY-Kグルコネート内液。

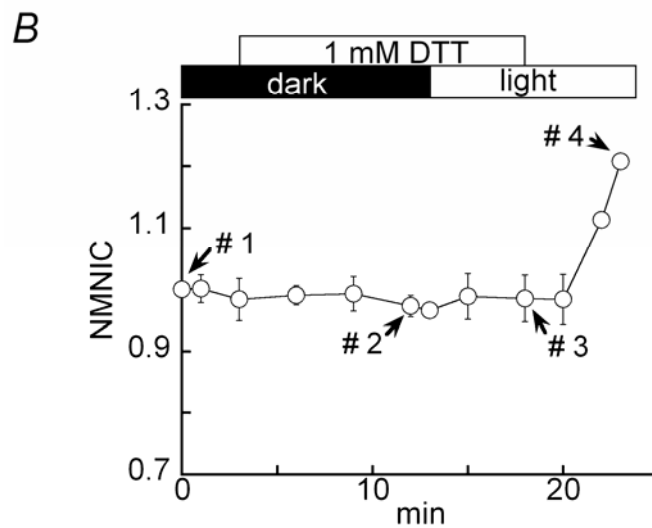
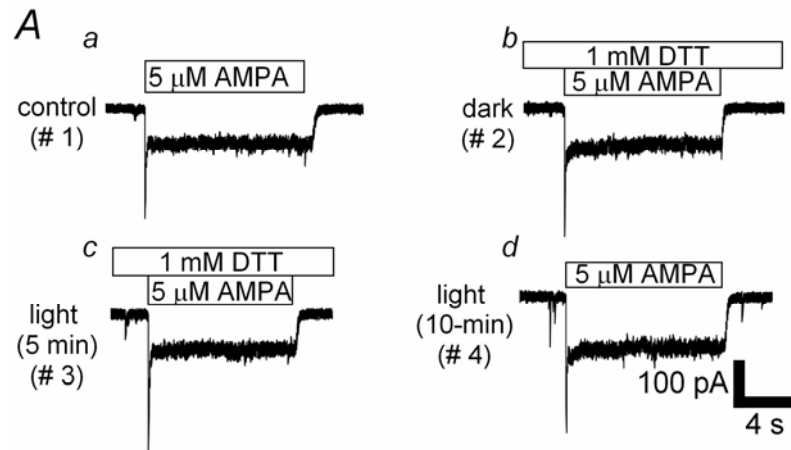


図 3-3 DTT 処理した培養海馬神経細胞 AMPA 受容体電流に対する LY 作用果

A, LY を注入した同一細胞から記録した AMPA 応答; a, 暗黒下 (control, #1); b, 1 mM DTT 存在下、暗黒下 (dark, #2); c, 1 mM DTT 存在下、5 分間励起光照射後 (light (5 min), #3); d, 10 分間励起光照射後 (light (10 min), #4)。# 1 から # 4 は、B に対応。保持電位 -70 mV。B, DTT 処理の効果。AMPA 応答の定常値 (刺激開始後、3 秒から 8 秒の平均値) を露光前に測定した AMPA 応答の定常値 (control) に対して規格化し (normalized magnitude of non-inactivating current, NMNIC)、露光時間に対してプロットしている。LY の AMPA 応答増強作用は、1 mM DTT 存在下で発現しない。プロットしたデータは、3 細胞から得た応答の平均値と標準偏差。LY-Cs 内液。

b. 暗黒下における遅延のpre-露光依存性

これまで示したように、LY作用の大きさは、励起光照射時間に依存した。さらに、味蕾細胞あるいは培養海馬神経細胞内に注入した後は、一切露光されていないLYも、電位依存性Na⁺チャネル電流に対して、LY作用を示した(図3-1)。すなわち、ギガオーム生成前に露光されたLY(pre-露光LY)は、その後露光されないにもかかわらず、電位依存性Na⁺電流の不活性化過程を遅延し、NICを発生させた(図3-4)。不活性化の時定数 $\tau_{inactivation}$ は、測定したすべての電位で増大した(図3-5A)。LYを注入していない味蕾細胞とpre-露光LYを注入した味蕾細胞の $\tau_{inactivation}$ の大きさを各電位固定電位において比較した。二元配置の分散分析 ($P < 0.05$) および多重比較(テューキーの方法、 $p < 0.05$)の結果、電位固定電位が-20 mV以下では、pre-露光LYの $\tau_{inactivation}$ が有意に大きいことがわかった。同様に、NMNICも、二元配置の分散分析 ($P < 0.05$) および多重比較(テューキーの方法、 $p < 0.05$)の結果、-25 mV以下で有意に大きいことがわかった。

細胞内へのLYの拡散の速度は、電極抵抗に依存している。例えば、4.8 M Ω 、6.0 M Ω 、8.9 M Ω の電極抵抗では、拡散の時定数は、それぞれ、52 s、96 s、217 s、であった。私が測定に用いた記録電極の電極抵抗は、5 M Ω 以下である。したがって、電位依存性Na⁺チャネル電流の測定を開始するホールセル2分後の時点において、細胞内のLY濃度は、すでに定常状態になっている。つまり、測定した細胞すべてにおいて、細胞内にLYが十分に拡散した条件下で実験を行った。

以下の実験は、培養海馬神経細胞より細胞が小さく、より正確な電位固定電流を得やすい味蕾細胞を用いて実験を行った。

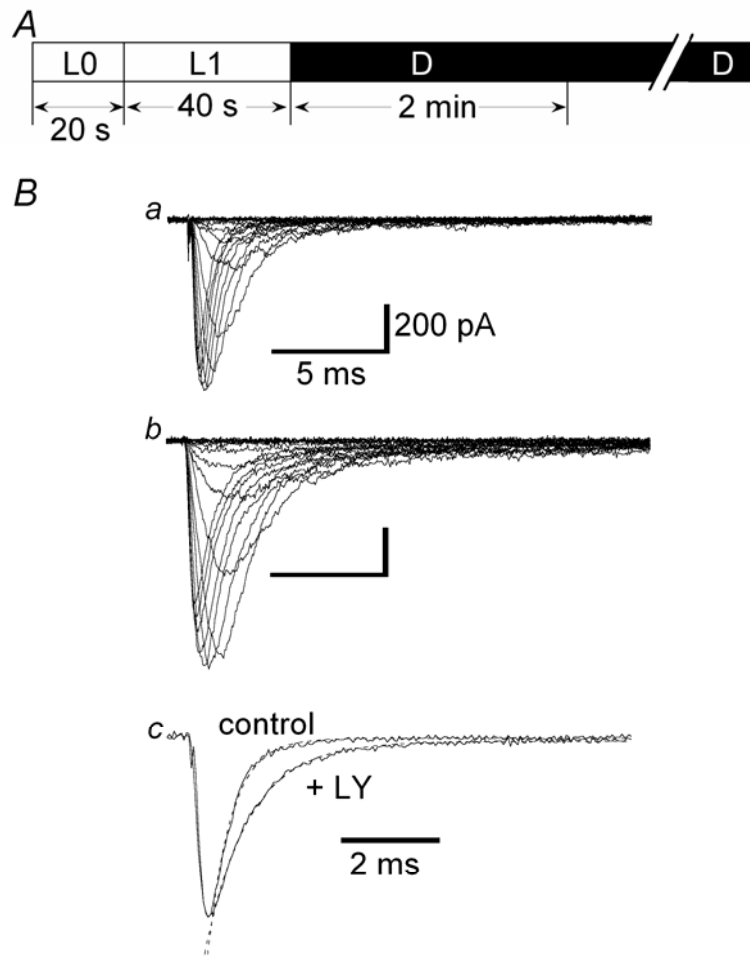


図 3-4 暗黒下におけるTTX感受性・電位依存性Na⁺チャネル不活性化過程に対するLY作用

A, 実験プロトコル。D期（暗黒期、以下の図においても同様）開始 2 分後に測定を開始。L0；実験室の照明光（～1000 lx、方法参照）。L1；検鏡のための照明光（5000 lx、方法参照）。D；暗黒期（照明を切った状態）。暗黒条件下でホールセルを形成し、補正後、測定を開始する。B, D期開始 2 分後以降に測定したLYを注入していない細胞(a)およびLYを注入した細胞(b)のTTX感受性Na⁺電流、およびa, bに示した電位固定電流の比較(c)。保持電位 -70 mV。a, bに示した電流は、刺激電位、-60 mV～+10 mVまで 5mV毎に対する電位固定電流。a, Cs内液；b, LY-Cs内液。c,それぞれのピーク電流値で規格化した-20 mVにおける電位固定電流。TTX非存在下で記録した電位固定電流と 1 μM TTX存在下で記録した電位固定電流の差をNa⁺電流として表示している。この図および以下の図の標本は、すべて味蕾細胞。

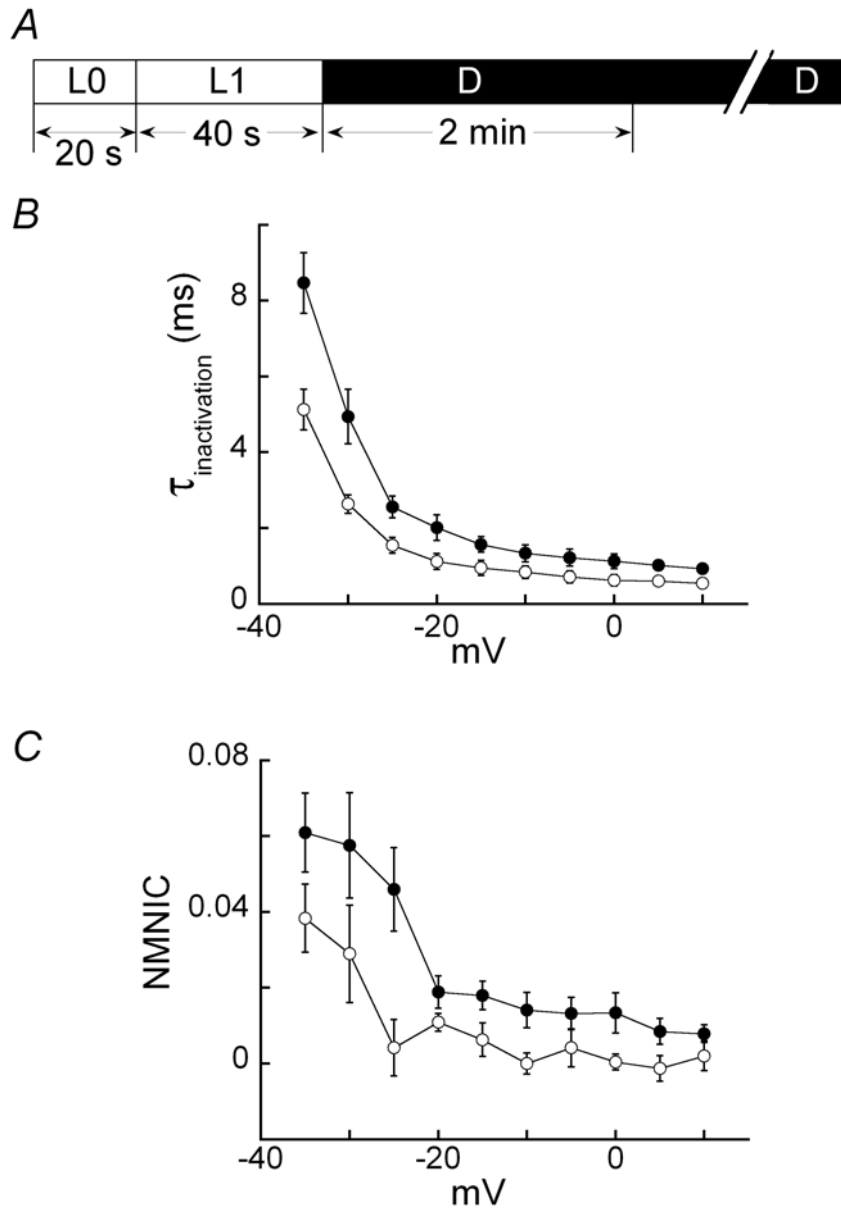


図 3-5 暗黒下における $\tau_{\text{inactivation}}$ と NMNIC に対する LY 作用の電位依存性

A, 実験プロトコル。D期開始 2 分後に測定を開始。図の表記は、図 3-4 と同じ。
 B, 各電位に対する LY を注入していない細胞 (○) と LY を注入した細胞 (●) の $\tau_{\text{inactivation}}$ の変化。
 C, 各電位に対する LY を注入していない細胞と LY を注入した細胞の NMNIC (normalized magnitude of NIC ; 各 Na^+ 電流のピーク値で規格化した NIC) の変化。プロットしたデータは、7 細胞から得た $\tau_{\text{inactivation}}$ と NMNIC の平均値と標準偏差。

c. 検鏡のための光照射による遅延

pre-露光LYは、細胞内に注入された後は一切露光されていないが、細胞を電位固定するまでに、実験室の照明光 (L0、20秒) と検鏡のための照明光 (L1、40秒) で露光されている (材料および方法 (照明) を参照)。この露光によって活性酸素種が生成し、不活性化の遅延を引き起こしている可能性がある。そこで、ギガオームシール形成後、任意の時間、LYに励起光 (pre-露光、L2、5000 lx、材料および方法 (照明) を参照) を照射した。その後、パッチ膜を破り細胞内へpre-露光されたLYを注入した。LYは、細胞内へ注入された後、一切露光しないようにし、電位依存性Na⁺電流の $\tau_{inactivation}$ およびNICの変化を調べた (図3-6、7)。

コントロール (記録電極内にLYがないとき) の $\tau_{inactivation}$ とNMNICは、L2の6分間照射によって変化しなかった。記録電極内にLYがあるとき、 $\tau_{inactivation}$ は、 2.01 ± 0.31 ms (mean \pm S.D., $n = 7$ 、コントロール) から 3.95 ± 0.34 ms ($n = 6$) に有意に増加した (t-検定、 $p < 0.05$)。NMNICも同様に、 0.019 ± 0.0041 ($n = 7$ 、コントロール) から 0.075 ± 0.012 ($n = 6$) に有意に増加した (t-検定、 $p < 0.05$)。つまり、 $\tau_{inactivation}$ とNMNICはL2によるpre-露光時間に依存して増加することがわかった。これらの結果は、pre-露光によってLY作用を引き起こす活性酸素種が生成すること、細胞内に注入されるまでその活性酸素種が消滅せずに存在していること、を示唆する。

私は、活性酸素種がこの暗黒下においても遅延作用を引き起こすと考え、DTT処理の効果を調べた (図3-6、7)。DTT処理後、pre-露光LYを注入した味蕾細胞とLYを注入しなかった味蕾細胞間では、 $\tau_{inactivation}$ やNMNICに有意差がなかった (t-検定、 $p > 0.05$)。この暗黒下でのLY作用に対するDTT処理効果は、励起光照射下で測定したDTT処理効果 (図3-1) と一致した。したがって、励起光下と暗黒下で同一の活性酸素種がLY作用を引き起こすと考えた。

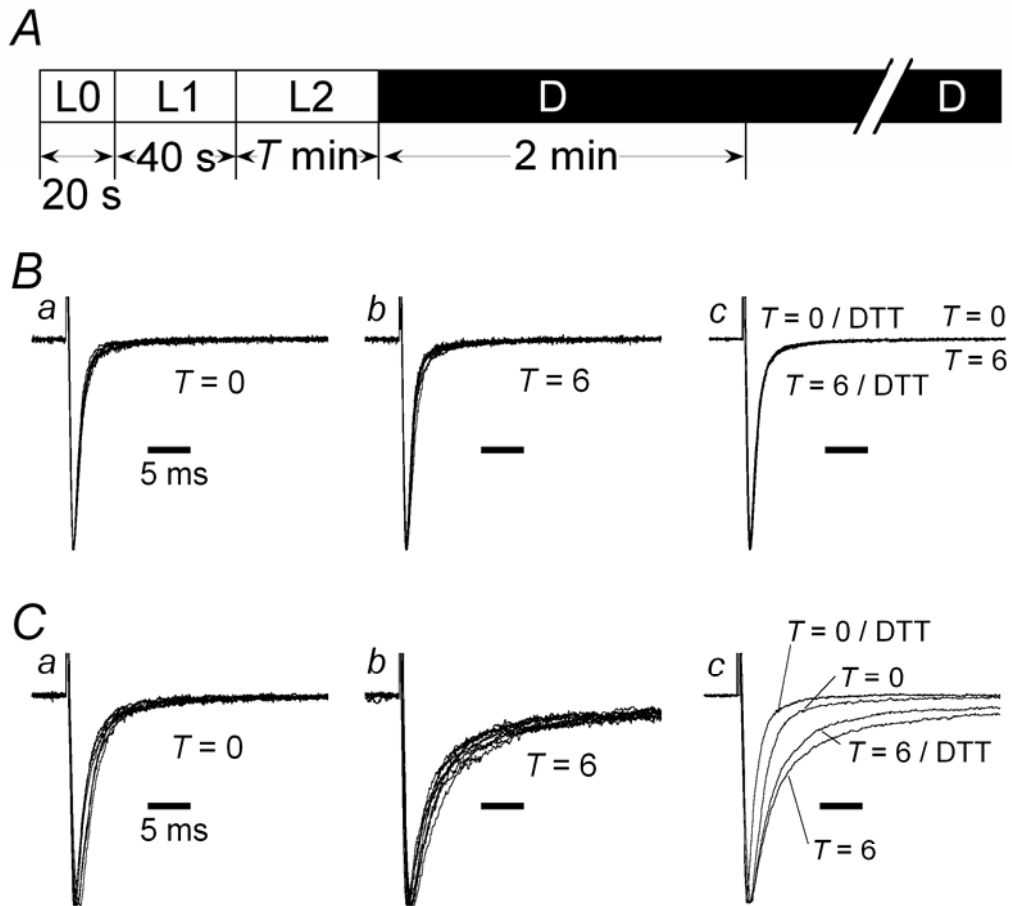


図 3-6 pre-露光の電位依存性Na⁺チャネル電流に対するLY作用

A, 実験プロトコル。表記は、図 3-4 と同じ。L2 ; 記録電極を励起する (pre-露光) ための照明 (5000 lx、方法参照)。D期開始 2 分後に測定を開始。B, 異なる時間pre-露光した、LYを注入していない細胞のNa⁺電流。a, L2 期なし ($T=0$) のNa⁺電流。b, L2 期 6 分間のNa⁺電流 ($T=6$)。aおよびbは 8 細胞の電流の重ね合わせ。c, $T=0$ 、 $T=6$ および DTT 処理後、 $T=0$ ($T=0/\text{DTT}$)、 $T=6$ ($T=6/\text{DTT}$) のNa⁺電流。表示した電流は、ピーク値で規格化し重ね合わせている。保持電位 -70 mV 。刺激電位 -20 mV 。Cs内液。C, 異なる時間pre-露光したLY注入細胞のNa⁺電流。Bと同様。aは 7 細胞、bは 6 細胞から記録した電流の重ね合わせ。LY-Cs内液。

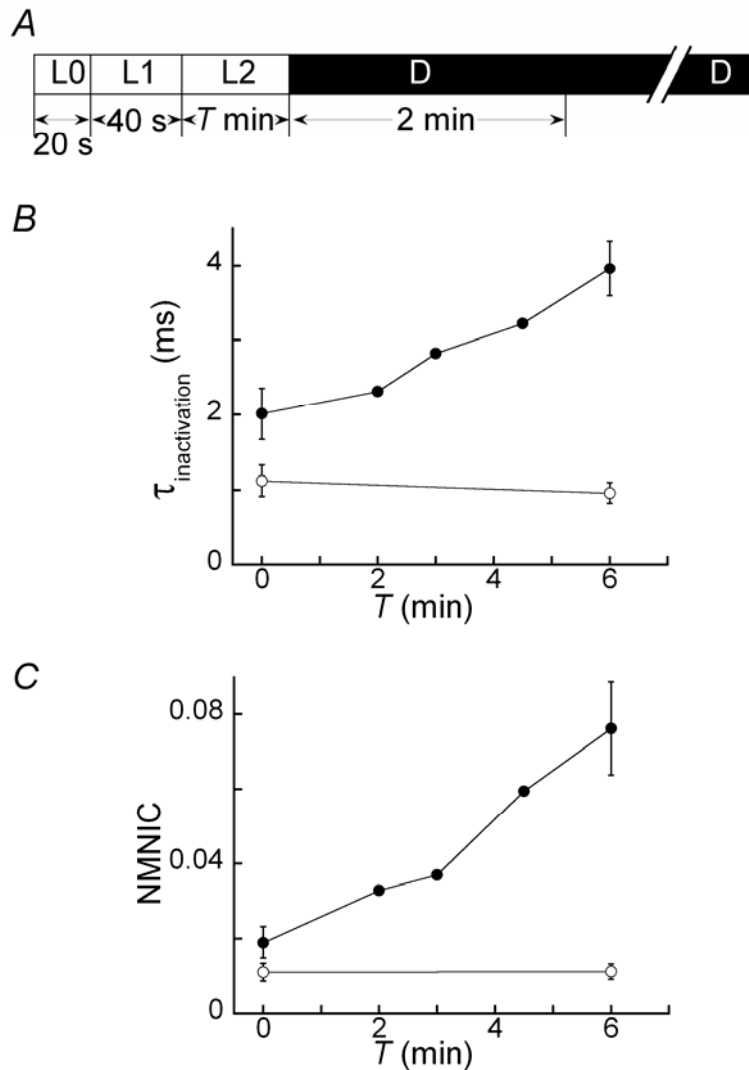


図 3-7 $\tau_{\text{inactivation}}$ と NMNIC の pre-露光時間依存性

A, 実験プロトコル。図の表記は、図 3-6 と同じ。D期開始 2 分後に測定を開始。

B, $\tau_{\text{inactivation}}$ の pre-露光時間依存性。L2 期 (T) に対する $\tau_{\text{inactivation}}$ プロット。pre-露光 LY 注入細胞 (●) の $\tau_{\text{inactivation}}$ は、L2 期の増加と共に増大する。L2 期 6 分間のときの $\tau_{\text{inactivation}}$ は、L2 期なし (0 分) のときより有意に大きい (t-検定, $p < 0.05$)。LY を注入していない細胞 (○) では、L2 期 0 分および 6 分で $\tau_{\text{inactivation}}$ に有意差がない (t-検定, $p > 0.05$)。プロットしたデータは、6 細胞から得た平均値と標準偏差。

C, NMNIC の pre-露光時間依存性。B と同様の NMNIC のプロット。pre-露光 LY 注入細胞 (●) において、L2 期 6 分間の NMNIC は、0 分の NMNIC より有意に大きい (t-検定, $p < 0.05$)。LY を注入していない細胞 (○) は、L2 期 0 分および 6 分で NMNIC に有意差がない (t-検定, $p > 0.05$)。

d. LY作用の時間依存的減衰

暗黒下のLY作用は、pre-露光によって生じることがわかった。pre-露光によって生成された活性酸素種は、暗黒下では、時間と共に減少する。十分に時間をおけば、この活性酸素種は消失し、パッチ膜を破って細胞内にLYを注入しても、LY作用は起こらないはずである。私は、pre-露光後細胞に注入するまでの時間を変化させ、このLY作用の強さの減衰を調べ、活性酸素種の寿命を推定した（図3-8）。

実験は、次のように行った。LY内液を充填した記録電極を顕微鏡下にセットした後、活性酸素種を生成させるために記録電極をL2で6分間照射し続けた。次に、生成した活性酸素種を消失させるために、任意の時間、暗黒条件で放置した。その後、40秒のL1照明下で（材料および方法参照）ギガオームシール形成後、暗黒下でホールセルクランプ条件を達成し、暗黒下で $\tau_{\text{inactivation}}$ およびNMNICを測定した。

$\tau_{\text{inactivation}}$ は、暗黒下に置く時間に対して時定数7.4分で減少した。カーブフィットによって得た定常状態の $\tau_{\text{inactivation}}$ は、1.70 msとなり、L0で20秒間、L1で40秒間照射し、LYを注入した細胞の $\tau_{\text{inactivation}}$ 、 $2.11 \pm 0.29 \text{ ms}$ ($n = 7$) とほぼ一致した。NMNICは、時定数5.0分で減少した。カーブフィットによって得た定常状態のNMNICは、0.015となり、L0で20秒間、L1で40秒間照射し、LYを注入した細胞のNMNIC、 0.017 ± 0.0037 ($n = 7$) とほぼ一致した。暗黒下でもLY作用が持続するというこれらの結果は、電極内における活性酸素種の寿命が長いことを示唆する。もし、LY作用の強さが活性酸素種の濃度に線形に依存するならば、活性酸素種の平均寿命は、 $\tau_{\text{inactivation}}$ とNMNICに対する減衰の時定数と等しく、5.0-7.4分となる。

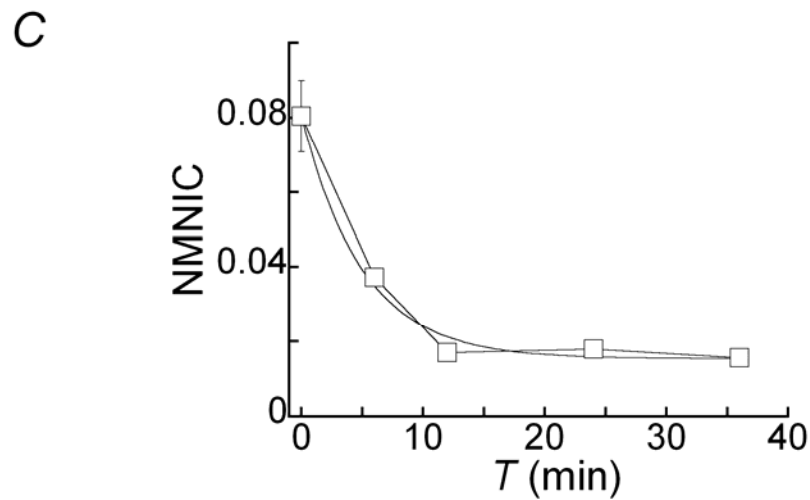
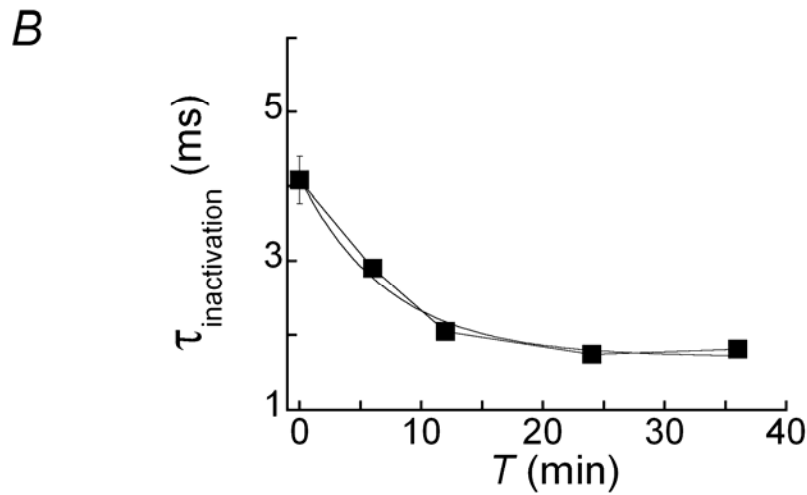
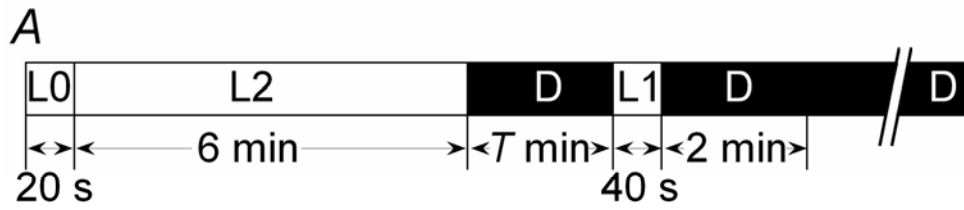


図 3-8 暗黒下放置時間に依存した遅延作用の減衰

A, 実験プロトコル。表記は、図 3-6 と同じ。2 回目の D 期開始 2 分後に測定を開始。B, $\tau_{\text{inactivation}}$ の D 期 (T) 依存的減衰。減衰の時定数 τ は、7.4 分。C, NMNIC の D 期 (T) 依存的減衰。減衰の時定数 τ は、5.0 分。 $T = 0$ でプロットしたデータは、3 細胞から得た $\tau_{\text{inactivation}}$ と NMNIC の平均値と標準偏差。

e. SODによるLY作用の阻害

断続的にL2露光したとき、LY作用は照明下で進行し、暗黒下で進行を停止した（図3-9）。第II章にも、同様の結果を示した（第II章、図2-7）。この結果は、LY効果を引き起こす活性酸素種の寿命が短いことを示唆する。一方、すでに述べたLY効果の減衰時定数が5.0-7.4分という結果（図3-8）は、この活性酸素種の寿命が長いことを示唆する。

活性酸素種の短寿命を示唆する実験（図3-9および第II章図2-7）と長寿命を示唆する実験（図3-8）では、LY効果を引き起こす活性酸素種の存在する環境が異なる。短寿命を示唆する実験は、細胞質の存在下で行われた。一方、長寿命を示す実験は、細胞質非存在下で行われた。したがって、私は、これら結果の矛盾が細胞質成分の有無に起因すると考えた。つまり、細胞質成分には、LY効果を引き起こす活性酸素種を消去する物質が存在すると考えた。

まず、各種細胞成分を含む新生牛血清をLY内液に加え、不活性化の遅延に対する効果を調べた（図3-10）。血清の添加は、断続的L2露光による $\tau_{inactivation}$ とNMNICの増加を抑制した。次に、血清成分でもあり、スーパーオキシドを特異的に消去する酵素、SODをLY内液に加え、断続的L2照射に対する効果を調べた。

SODとLYを添加した電極内液を用いたとき、 $\tau_{inactivation}$ は、 0.90 ± 0.20 ms ($n = 4$)であった。LYのみを添加した電極内液を用いたとき、 $\tau_{inactivation}$ は、 1.91 ± 0.35 ms ($n = 6$)であった。SODもLYも添加していない電極内液を用いたとき、 $\tau_{inactivation}$ は、 1.09 ± 0.23 ms ($n = 6$)であった。これらの間には有意な差があった（一元配置の分散分析、 $p < 0.05$ ）。多重比較の結果、SODは、 $\tau_{inactivation}$ の増加を有意に抑制した（シェフェの方法による多重比較、 $p < 0.005$ ）。NMNICは、SODとLYを添加したとき、 0.010 ± 0.0020 ($n = 4$)、LYのみを添加したとき、 0.019 ± 0.0036 ($n = 6$)、SOD、LYを添加しないとき、 0.011 ± 0.0023 ($n = 6$)であった。これらの間には有意な差があった（一元配置の分散分析、 $p < 0.05$ ）。多重比較の結果、SODは、NMNICの増加を有意に抑制した（シェフェの方法による多重比較、 $p < 0.01$ ）。

このように、SODも血清と同様に、LY作用を抑制した。これらの結果は、電位依存性Na⁺電流の不活性化遅延作用を引き起こす活性酸素種は、スーパーオキシドであることを示唆する。

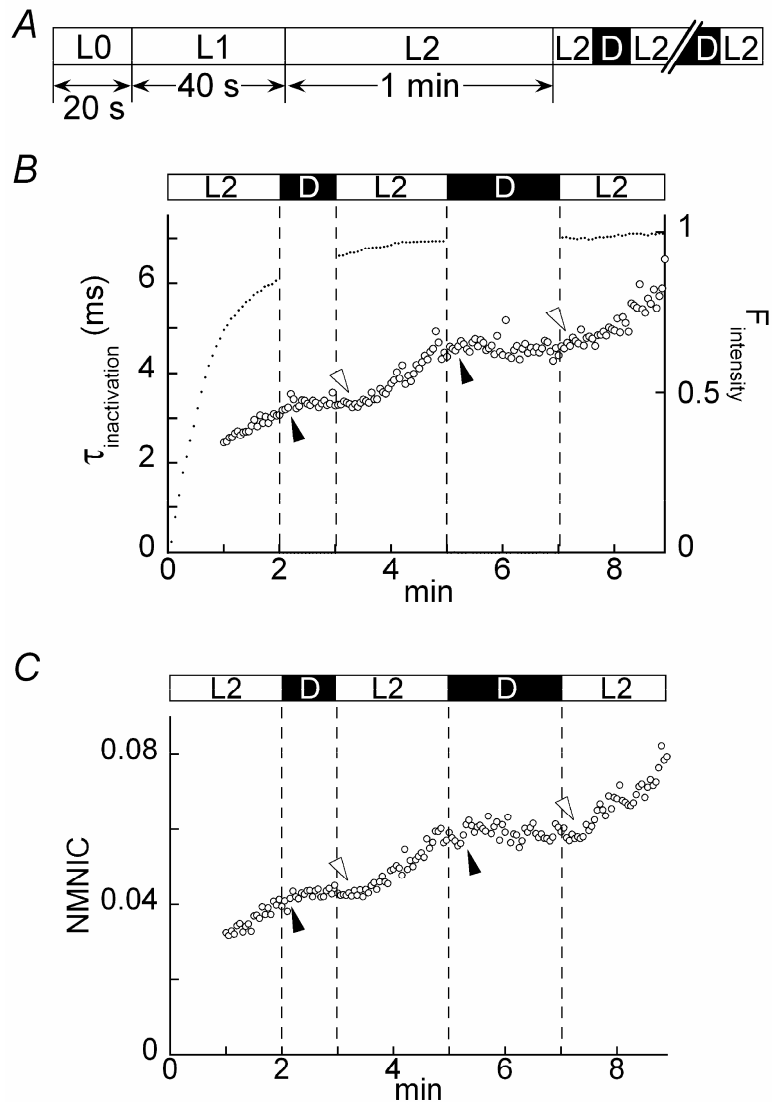


図 3-9 LY 作用の励起光照射時間依存性

A, 実験プロトコル。表記は、図 3-6 と同じ。L2 期開始 1 分後に Na⁺電流の測定を開始。B, 断続的励起光照射による $\tau_{\text{inactivation}}$ (○) と味蕾細胞内 LY の蛍光強度の経時変化 (●)。ホールセルクランプ開始時を 0 として、 $\tau_{\text{inactivation}}$ と記録電極からの拡散による細胞内 LY の蛍光強度 ($F_{\text{intensity}}$) 変化を時間に対してプロットしている。この記録電極 (4.8 M Ω) では、蛍光強度増加の時定数は、52 秒。C, 断続的励起光照射による NMNIC の経時変化。励起光照射開始後すぐには $\tau_{\text{inactivation}}$ および NMNIC は変化しない。白抜き矢頭は、励起光照射開始後の $\tau_{\text{inactivation}}$ および NMNIC の増加の遅れを示している。塗りつぶし矢頭は、暗黒状態開始後の $\tau_{\text{inactivation}}$ および NMNIC の増加停止の遅れを示している。

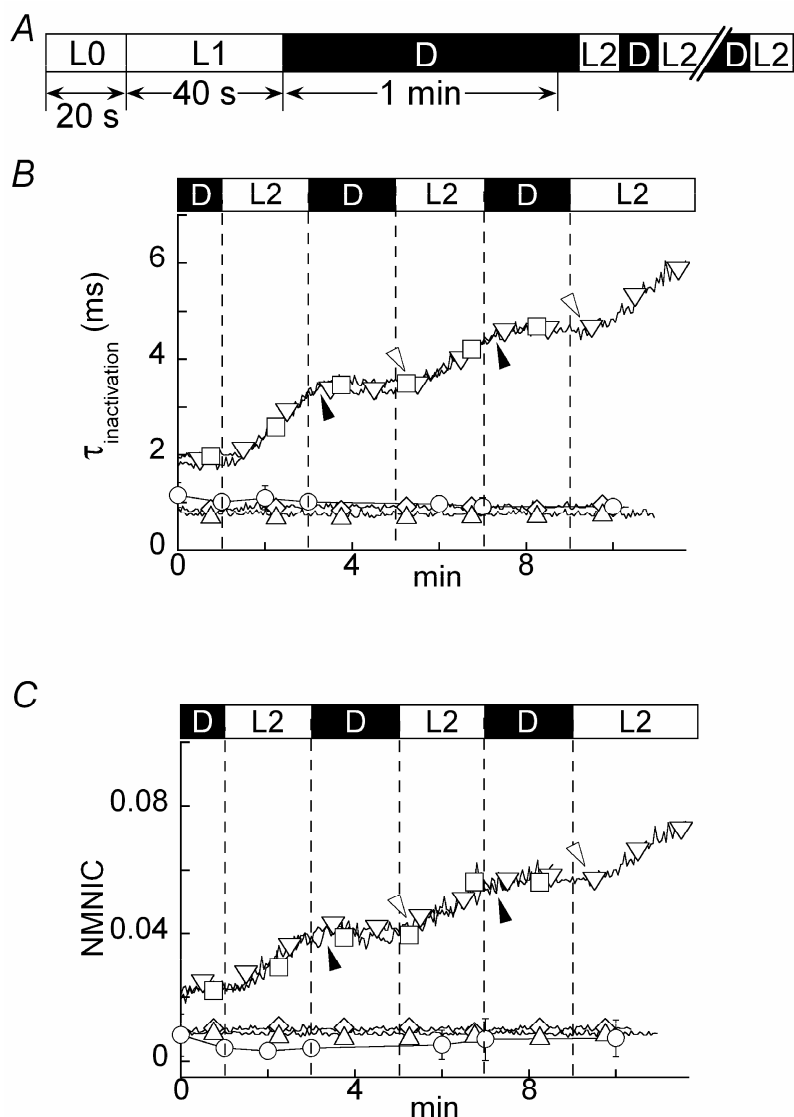


図 3-10 血清、SOD による LY 作用の抑制

A, 実験プロトコル。表記は、図 3-6 と同じ。最初のD期開始 1 分後に測定を開始。B, 断続的励起光照射における $\tau_{\text{inactivation}}$ の経時変化。C, 断続的励起光照射における NMNIC の経時変化。○; LY を注入していない細胞。□; LY を注入した細胞。△; LY と血清を注入した細胞。◇; LY と SOD を注入した細胞。▽; LY と熱処理した SOD を注入した細胞。LY と熱処理した SOD を注入した細胞では、図 3-9 と同様に、励起光照射開始後すぐには $\tau_{\text{inactivation}}$ および NMNIC は変化しない。□、△、◇ は、30 データ点毎にプロットし、残りのデータ点をドット点としてプロットしている。▽ は、20 データ点毎にプロットしている。○ は、すべてのデータ点をプロットしている。矢頭の表記は、図 3-9 と同じ。

Ⅲ-4. 考察

本実験において、pre-露光LYは暗黒下でも電位依存性Na⁺電流の不活性化過程を遅延させること（図3-4、6、7）がわかった。暗黒下で発現するLY作用は、DTT処理によって抑制されることを含め（図3-6）、励起光照射下におけるLY作用とよく一致することから（第Ⅱ章図2-6）、暗黒下と励起光照射下におけるLY作用を引き起こす活性酸素種は同一である、と結論した。また、第Ⅱ章で示した、各種イオンチャネル電流に対するLY作用も、同一の活性酸素種が引き起こすと推測した。

SODは、スーパーオキシドを特異的な基質とし、過酸化水素に変換する（図3-11）。SODが電位依存性Na⁺チャネル電流に対するLY作用を抑制したことから、LY作用に重要な役割を持つ活性酸素種はスーパーオキシドであり、過酸化水素ではないと結論した。

ペルオキシナイトライトは、スーパーオキシドとNOの反応から生成される。SODによるスーパーオキシドの消費は、ペルオキシナイトライトの生成を阻害する。しかし、以下に述べるように、ペルオキシナイトライトがLY作用を引き起こすとは考えにくい。まず、細胞内環境はLY内液に置換されているため、NO生成に必要なタンパク質などは、細胞内から記録電極に拡散し、希釈されている可能性が高い。したがって、NOは、隣接する味蕾細胞から拡散してくる必要がある。隣接する細胞がNOを生成するならば、NOは膜透過性であるため、測定中の細胞内に拡散し、スーパーオキシドと反応することになる。しかし、実験中の細胞外液灌流により、NOの拡散は、もしあるとしても、阻害されるはずである。また、LY作用は、味蕾細胞より細胞同士の間隔が離れたマウス培養海馬神経細胞においても生じた。さらに、片山は、近隣に細胞が存在しない、outside-outパッチ法で単一電位依存性Na⁺チャネル電流に対するLY作用を確認した（Higure et al., 2003）。したがって、ペルオキシナイトライトがLY作用を引き起こす可能性は低い、と考えた。

フェントン反応は、スーパーオキシドからヒドロキシルラジカルを直接生成する。しかし、この反応に必要な銅および鉄イオンが電極内液に含まれていないため、本実験環境では、ヒドロキシルラジカルは生成されにくい。したがって、ヒドロキシルラジカルは、LY作用を引き起こさないと考えた。

LY作用には選択性があることから、LY作用感受性をもつチャネルは共通のアミノ酸配列をもつ可能性についてII章の考察で述べた。LYはこのアミノ酸配列に結合し、この部位でスーパーオキシド生成することで、LY作用を発揮しているのかもしれない。

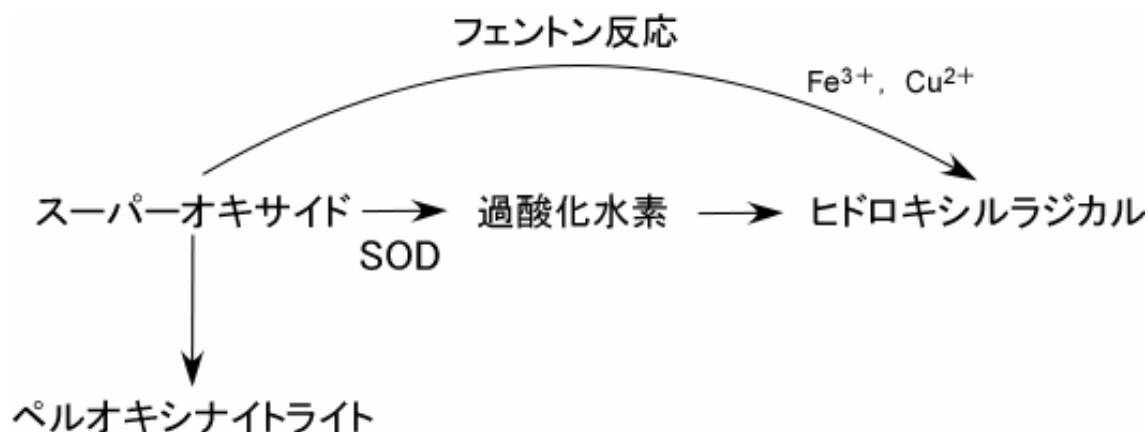


図 3-11 活性酸素の生成

活性酸素種のチャネル機能阻害に関しては、いくつかの報告がある。多様な K^+ チャネル (Goldhaber et al., 1989; Duprat et al., 1995; Tokube et al., 1996; Amstead, 1997; Sobey et al., 1997; Brzezinska et al., 2000) およびL-type Ca^{2+} チャネル (Tokube et al., 1996) の活性を変化させるという報告である。高濃度 (20 mM以上) の過酸化水素が電位依存性 Na^+ チャネルを修飾するという報告 (Wang and Wang, 2002) もある。第I章で、励起された蛍光色素や露光自身が細胞の機能に影響を与えることを紹介した。これらの中で、ローズベンガルは、光依存的に活性酸素種の一つ、一重項酸素を生成し、薬理作用を示すことが明らかにされている (Duprat et al., 1995)。ローズベンガル以外の上記の色素の作用にも、活性酸素種が関与しているのかもしれない。しかし、スーパーオキシドが電位依存性 Na^+ チャネルを修飾するという報告は、本報告が始めてである。

LYを用いたパッチクランプ実験では、LYによるアーティファクトを除外するために、SODの記録電極内添加が有効かもしれない。しかし、SODは、スーパーオキシドから過酸化水素への反応を触媒するため、SODの添加によって、細胞内あるいは記録電極内に多量の過酸化水素が生成し、チャネルが傷害を受ける可能性もある。したがって、SODと同時にカタラーゼ (過酸化水素から水と酸素への反応を触媒) の添加が必要かもしれない。

スーパーオキシドは、生理的環境でも、細胞内に生成する。生理的に生成したスーパーオキシドの濃度は、活動電位の持続時間延長（第Ⅱ章図2-9）を引き起こす程度に上昇するかもしれない。活動電位の持続時間延長は、神経伝達物質の放出量を増加し、細胞の応答を増幅することになる。スーパーオキシドは、すでに述べた老化（Beckman and Ames, 1998; Alexeyev et al., 2004; Hussain and Mitra, 2004）、炎症（McCord, 1974; Guzik et al., 2003）、ガン（Oberley and Buettner, 1979; Totter, 1980）、膜障害（Adelman et al., 1988）のような疾患ばかりでなく、神経活動の調整にも利用されているのかもしれない。

熱処理して不活性化させたSODは、LY作用を阻害しなかった（図3-10）。しかし、励起照明後、暗黒下にすると直ちにLY作用の進行が停止した。細胞内に全くSODが存在しなければ、励起照明後、暗黒下にしても、LY作用が進行するはずである。この結果は、細胞内に内在性SODが存在し、LY作用の進行を阻害することを示唆している。

LY作用を受けた電位依存性Na⁺チャネル電流の $\tau_{inactivation}$ は、連続的に変化した。LY作用を受けていない電位依存性Na⁺チャネル電流から求めた $\tau_{inactivation}$ と非不活性化電流を組み合わせても、適切なカーブフィットは、できなかった。すなわち、カーブフィットに用いた式（材料および方法（カーブフィット）を参照）の $\tau_{inactivation}$ を固定すると、その他のパラメータを変化させても、カーブフィットできないことがわかった。この結果は、単一の電位依存性Na⁺チャネルには、LY作用によって修飾を受ける部位が多数あり、修飾を受けた部位の数が増加するにつれて、チャネル開口時間が増加することを示唆する（Higure et al., 2003）。

本研究でLY作用は、スーパーオキシドによることが明らかとなった。したがって、電位依存性Na⁺チャネルのチャネル開口時間は、スーパーオキシドを結合することで修飾を受けた部位の増加に伴い増加すると考えた。

暗黒下では、電位依存性Na⁺チャネルに対するLY作用は測定開始直後に生じるが、その後、進行しなかった（図3-9、10、12）。この一過性の進行を説明するため、内在性膜結合性SODの存在を仮定した。SODは、大きく3種に分類されており（McCord and Fridovich, 1969; Weisiger and Fridovich, 1973; Marklund et al., 1982）、細胞内にも存在

すること (McCord and Fridovich, 1969)、膜結合型が存在すること (Fujii et al., 1998; Regelsberger et al., 2002)、が報告されているため、この仮定は合理的である。また、電位依存性Na⁺チャンネルについては、スーパーオキシドを結合した部位の増加に伴い、残りの部位のスーパーオキシド親和性が低下すると仮定した。これらの仮定に基づき、以下のような修飾機構を考えた (図3-13)。

室内灯による照明 (L0)、顕微鏡による照明 (L1) によって、記録電極内にはスーパーオキシドが生成されている。細胞膜を破ると、記録電極から生成されたスーパーオキシドが継続的に細胞内へ拡散する (図3-13A)。スーパーオキシドは、電位依存性Na⁺チャンネルに多数ある結合部位の一部に迅速に結合する。その後、ゆっくりと修飾し (図3-9、10参照)、結合量に応じて不活性化を阻害する。遊離のスーパーオキシドは、SODによって直ちに分解される。SODの分子活性は、最も速い分子活性をもつ酵素、カタラーゼ、とほぼ同じ程度である (山根、1980; 勝部、谷口、1990) という事実は、この仮定を支持する。したがって、電位依存性Na⁺チャンネルは、SODからスーパーオキシドを保護していることになる。この結果、測定開始直後にLY作用が観測できる (図3-13B) と考えた。

修飾を受けた電位依存性Na⁺チャンネルには、まだ多数のスーパーオキシド結合部位が空で、したがって、未修飾で残っている。しかし、すでに一部の結合部位にスーパーオキシドが結合しているため、残りのスーパーオキシド結合部位のスーパーオキシドに対する親和性が低下する。このため、持続的に流入するスーパーオキシドは、電位依存性Na⁺チャンネルに結合しにくくなり、すなわち、保護されにくくなり、結合する前に分解される。このため、作用が進行しない (図3-13C) と考えた。

LYも細胞内に流入している。細胞に励起光を照射すると、細胞内にスーパーオキシドが生成され、スーパーオキシド濃度が上昇する。電位依存性Na⁺チャンネルにある“未使用”のスーパーオキシド結合部位は、スーパーオキシドに対する親和性が低下しているが、スーパーオキシド濃度が上昇したため、スーパーオキシドを結合する。その結果、励起光照射中、LY作用が進行する (図3-13D) と考えた。

再び暗黒下になると、LY作用の進行が停止する。これは、“未使用”の結合部位のスーパーオキシド親和性が低下した上に、その数も減少したため、スーパーオキシドに対する保護作用がさらに減弱したためと考えた。

すなわち、内在性SODが容易に励起光照射によって生成したスーパーオキサイドを分解したことによる(図3-13E)と考えた。

電位依存性Na⁺チャネルは、修飾を受ける部位は少数、例えば一個、しかもっていないのかもしれない。この部位がスーパーオキサイドを結合し、修飾を受けるたびに、開口時間が増加するのかもしれない。したがって、スーパーオキサイド結合部位は、修飾を受けるたびにそのスーパーオキサイド親和性を低下させると仮定することになる。この場合も、LY作用を説明できる。

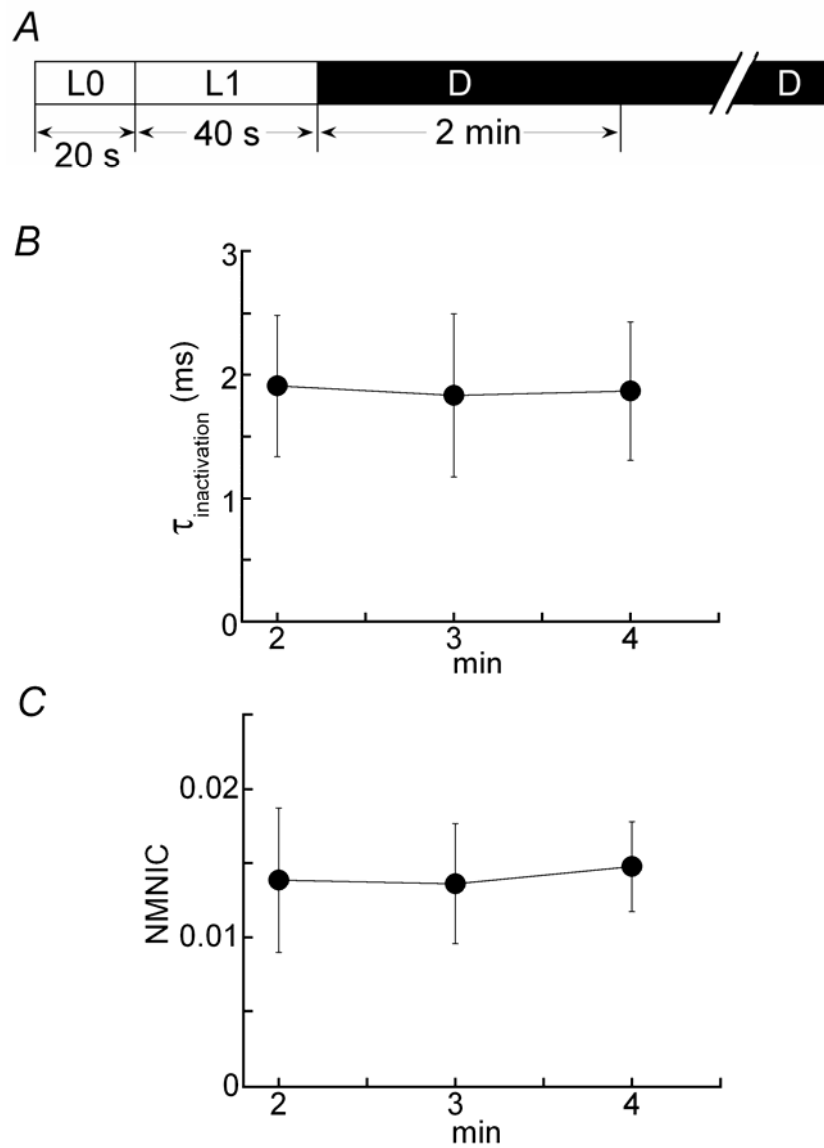


図 3-12 暗黒下の $\tau_{\text{inactivation}}$ と NMNIC の経時変化

A, 実験プロトコル。D期開始 2 分後に測定開始。表記は、図 3-4 と同じ。B, $\tau_{\text{inactivation}}$ の経時変化。ホールセルクランプ法開始時を 0 として、時間に対して $\tau_{\text{inactivation}}$ をプロットしている。C, NMNIC の経時変化。プロットしたデータは、3 細胞から得た $\tau_{\text{inactivation}}$ と NMNIC の平均値と標準偏差。

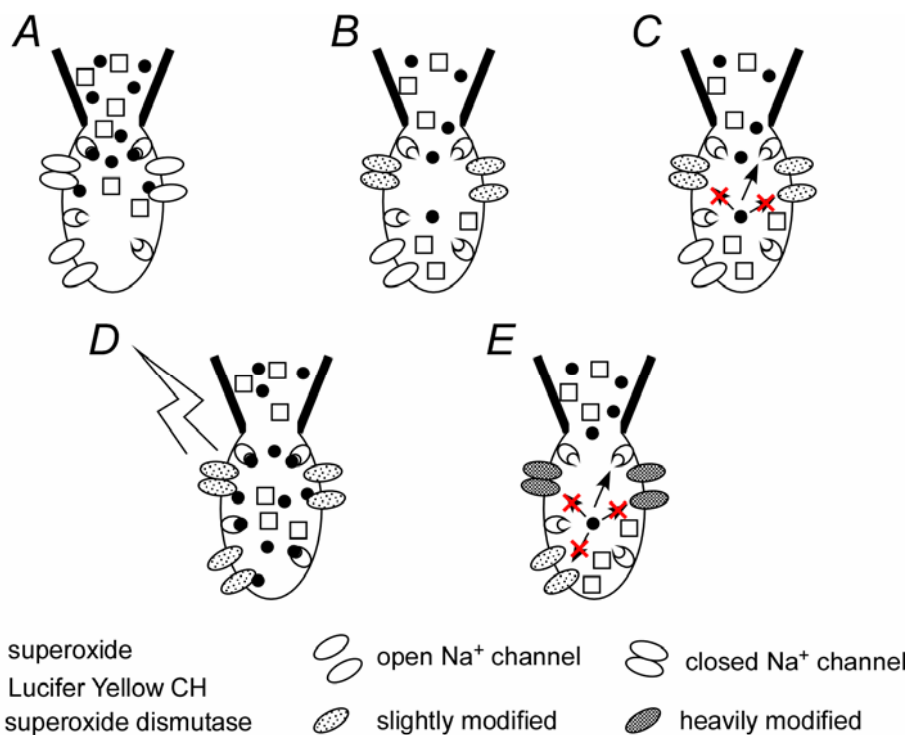


図 3-13 電位依存性Na⁺チャネルに対するLY作用に関する仮説

A, 暗黒下でパッチ膜を破った直後の味蕾細胞の模式図。記録電極から流入してきたスーパーオキシドは、素早くNa⁺チャネルに結合する。結合できないスーパーオキシドは、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)によって素早く分解される。Na⁺チャネルは、多数のスーパーオキシド結合部位をもち、修飾された部位数の増加に従い、開口時間が延長する(図には表示していない)。B, 測定開始直後の細胞の模式図。Na⁺チャネルに結合したスーパーオキシドは、Na⁺チャネルの不活性化を、ゆっくりと、結合量に応じて遅延する。修飾には時間がかかる。測定開始直後では、修飾を受けたNa⁺チャネルが少数のため、遅延の程度は低い。C, 光照射前の暗黒下における細胞の模式図。修飾を受けたNa⁺チャネルは、スーパーオキシドに対する親和性が低下しているため、新たな結合は生じない。結合できないスーパーオキシドはSODによって分解される。D, 光照射中の細胞の模式図。光照射によって、スーパーオキシドは細胞内および記録電極内に新たに生成し、濃度が上昇する。すでに修飾を受けたNa⁺チャネルのスーパーオキシドに対する親和性は低下しているが、スーパーオキシド濃度が高いため、結合し、その後ゆっくりと修飾される。E, 再暗黒下の細胞の模式図。Cと同様に、スーパーオキシド結合部位の親和性が低下しているため、スーパーオキシドは、Na⁺チャネルと結合できない。

結語

細胞は小さく、しかも複雑である。細胞を個別に染色することで、細胞をみる見方が変わる。その形態の複雑さ、精密さが一目瞭然となるからである。多くの研究者や技術者の努力によって今では、細胞のさまざまな器官を染め分けることさえ可能になっている。しかし、色素を用いて機能と形態との関連を調べるとき、色素によるアーティファクトの可能性を無視できない。事実、私は本研究において、蛍光色素、LYが細胞機能を傷害することを明らかにした。本来、味蕾細胞間ネットワークを調べるために用いたはずのLYがこのようなチャンネル機能傷害を起こすとは思ってもしなかった。実験は、多くの謎を解明するが、それと同時にアーティファクトも生み出す可能性がある。研究者は、実験の中で、アーティファクトに埋もれて隠れている真の現象を正確につかみとらなければならない。本論文は、研究そのものに深く根ざすアーティファクトの危険性を再認識させるものであると考えている。

スーパーオキシドは、老化、ガン、炎症などの疾患病態との関連が示唆されている。私は、スーパーオキシドが比較的選択的にチャンネルを修飾することを明らかにした。細胞膜にはきわめて多数のタンパク質が貫通しており、それらの中にはチャンネルやトランスポーターやレセプターとして働き、外界との間で物質や情報のやり取りをしているものがある。最近次々、多くの疾病がチャンネル病、トランスポーター病、レセプター病として捉えられるようになり、その病態解明や治療法開発のために膜タンパクの研究が重要となっている。まだ調べられていないチャンネルにも、スーパーオキシドは、作用するかもしれない。スーパーオキシドに感受性を持つチャンネルの種類を明らかにし、その機能変化を明らかにすることは、これらの疾患を理解するために不可欠である。

LYの作用を明らかにしたことで、LYは、より使い易い蛍光色素になった。細胞を染める色素という枠を超えた使い方もできるだろう。活性酸素と病気という点においても、新たな知見を我々に与える可能性を示した。以上

の点において、この研究が、さらなる真実を明らかにするきっかけになる
ものだと確信している。

参考文献

- Alexeyev, M. F., Ledoux, S. P. & Wilson, G. L. (2004). Mitochondrial DNA and aging. *Clin Sci (Lond)* 107, 355-364.
- Armstrong, C. M., Bezanilla, F., & Rojas, E. (1973). Destruction of sodium conductance inactivation in squid axons perfused with pronase. *J Gen Physiol*, 62, 375-391.
- Armstrong, C. M. & Bezanilla, F. (1977). Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol*, 70, 567-90.
- Beckman, K. B. & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Brewer, G. J., & Cotman, C. W. (1989). Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen. *Brain Res.*, 494, 65-74.
- Caicedo, A., Jafri, M. S., & Roper, S.D. (2000). In situ Ca^{2+} imaging reveals neurotransmitter receptors for glutamate in taste receptor cells. *J Neurosci*, 20(21), 7978-7985.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L. & Waxman, S. G. (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev*, 57, 397-409.

De Weille, J.R., Muller, M. & Lazdunski, M. (1992). Activation and inhibition of ATP-sensitive K⁺ channels by fluorescein derivatives. *J Biol Chem* 267, 4557-4563.

Duprat, F., Guillemare, E., Romey, G., Fink, M., Lesage, F., Lazdunski, M. & Honore, E. (1995). Susceptibility of cloned K⁺ channels to reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11796-11800.

Fujii, M., Ishii, N., Joguchi, A., Yasuda, K. & Ayusawa, D. (1998). A novel superoxide dismutase gene encoding membrane-bound and extracellular isoforms by alternative splicing in *caenorhabditis elegans*. *DNA Res* 5, 25-30.

Furue, H & Yoshii, K. (1997). In situ tight-seal recordings of taste substance-elicited action currents and voltage-gated Ba currents from single taste bud cells in the peeled epithelium of mouse tongue. *Brain Res* 776, 133-139.

Furue, H., Fudamoto, N., Ohtubo, Y., & Yoshii, K. (1997). Phenytoin protected mouse corical cell cultures against neurotoxicity induced by kainite but not by NMDA. *Amino Acids*, 12, 179-184.

Furue, H. & Yoshii, K. (1998). A method for in-situ tight-seal recordings from single taste bud cells of mice. *J Neurosci Methods* 84, 109-114.

Guzik, T. J., Korbout, R. & Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 54, 469-487.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., & Sigworth, F. J. (1981). Improvements in optical methods for measuring rapid changes in membrane potential. *J Membr Biol*, 58(2), 123-137.

Hamilton, T. C., & Weston, A. H. (1989). Chromakalim, nicorandil and pinacidil: Novel drugs which open potassium channels in smooth muscle. *Gen Pharmacol*, 20, 1-9.

Herness, S., Zhao, F. L., Kaya, N., Lu, S. G., Shen, T., & Sun, X.D. (2002). Adrenergic signaling between rat taste receptor cells. *J Physiol*, 543(Pt2), 601-614.

Higure, Y., Katayama, Y., Takeuchi, K., Ohtubo, Y. & Yoshii, K. (2003). Lucifer Yellow slows voltage-gated Na⁺ current inactivation in a light-dependent manner in mice. *J Physiol* 550, 158-167.

Hussain, A. M. & Mitra, A. K. (2004). Effect of reactive oxygen species on the metabolism of tryptophan in rat brain: influence of age. *Mol Cell Biochem* 258, 145-153.

Jagger, D. J., & Forge, A. (2006). Compartmentalized and Signal-selective gap junctional coupling in the hearing cochlea. *J Neurosci*, 26(4), 1260-1268.

Kaya, N., Shen, T., Lu, S.G., Zhao, F. L., & Herness, S. (2004). A paracrine signaling role for serotonin in rat taste buds: expression and localization of serotonin receptor subtypes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286(4), R649-658.

Kim D. J., & Roper, S. D. (1995). Localization of serotonin in taste buds: a comparative study in four vertebrates. *J Comp Neurol*, 353(3), 364-370.

Kim, Y. V., Bobkov, Y. V., & Kolesnikov, S. S. (2000). Adenosine triphosphate mobilizes cytosolic calcium and modulates ionic currents in mouse taste receptor cells. *Neurosci Lett*, 290(3), 165-168.

Koppenhofer, E., & Schmidt, H. (1968a). Effect of scorpion venom on ionic currents of the node of Ranvier. II. Incomplete sodium inactivation. *Pflugers Arch* 303,150-161.

Koppenhofer, E., & Schmidt, H. (1968b). Effect of scorpion venom on ionic currents of the node of Ranvier. I. The permeabilities PNa and PK. *Pflugers Arch* 303,133-149.

Kumar, N. M., & Gilula, N. B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell*, 84(3), 381-388.

Leszkiewicz, D., Kandler, K., & Aizenman, E. (2000). Enhancement of NMDA receptor-mediated currents by light in rat neurons in vitro. *J Physiol*, 524(Pt2), 365-374.

Leszkiewicz, D. & Aizenman, E. (2002). A role for the redox site in the modulation of the NMDA receptor by light. *J Physiol* 545, 435-440

Loewenstein, W. R. (1981). Junctional intercellular communication : the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev*, 61(4), 829-913.

McCord, J. M. (1974). Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science* 185, 529-531.

McCord, J. M. & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase; An

enzymatic function for erythro-cuprein (Hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055.

Marklund, S. L., Holme, E. & Heller, L. (1982). Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clinica Chemica Acta* 126, 41-51.

Michelson, H. B., & Wong, R. K. (1994). Synchronization of inhibitory neurones in the guinea-pig hippocampus in vitro. *J Physiol.*, 477.1, 35-45.

Muramatsu, I., Fujiwara, M., Miura, A., & Narahashi, T. (1985). Effects of Goniopora toxin on crayfish giant axons. *J Pharmacol Exp Ther*, 234, 307-315.

Narahashi, T., Moore, J. W. & Shapiro, B. I. (1969). Condylactis toxin: interaction with nerve membrane ionic conductances. *Science*, 163, 680-681.

Noguchi, T., Ishii, K., Ohtubo Y., Shuto, S., Ono, S., Matsuda, A., & Yoshii, K. (1999). Open channel block of NMDA receptors by conformationally restricted analogs of milnacipran and their protective effect against NMDA-induced neurotoxicity. *Synapse*, 31(2), 87-96.

Oberley, L. W. & Buettner, G. R. (1979). Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 39, 1141-1149.

Ogura, T. (2002). Acetylcholine increases intracellular Ca^{2+} in taste cells via activation of muscarinic receptors. *J Neurophysiol*, 87(6), 2643-2649.

Oxford, G. S., Wu, C. H., & Narahashi, T. (1978). Removal of sodium channel inactivation in squid giant axons by n-bromoacetamide. *J Gen Physiol*, 71, 227-247.

Partin, K. M., Patneau, D. K., Winters, C. A., Mayer, M. L., & Buonanno, A. (1993). Selective modulation of desensitization at AMPA versus kainite receptors by cyclothiazide and comcanavalin A. *Neuron*, 11, 833-843.

Regelsberger, G., Atzenhofer, W., Ruker, F., Peschek, G., Jakopitsch, C., Paumann, M., Furtmuller, P. G. & Obinger, C. (2002). Biochemical characterization of a membrane-bound manganese-containing superoxide dismutase from the cyanobacterium *anabaena* PCC7120. *J Biol Chem.*, 277, 43615-43622.

Saez, J. C., Connor, J. A., Spray, D. C., & Bennett, M. V. (1989). Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(8), 2708-2712.

Sanderson, M. J., Charles, A. C., Boitano, S., & Dirksen, E. R. (1994). Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol*, 98(2), 173-187.

Sobey, C. G. (1997). Mechanisms of bradykinin-induced cerebral vasodilatation in rats. Evidence that reactive oxygen species activate K⁺ channels. *Stroke* 28, 2290-2294.

Somjen, G. G. (2000). Enhancement of persistent sodium current by internal fluorescence in isolated hippocampal neurons. *Brain Res* 885, 94-101.

Takeda, Y., Ward, S. M., Sanders, K. M., & Koh, S. D. (2004).

Effects of the gap junction blocker glycyrrhetic acid on gastrointestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288, G832-G841.

Tokube, K., Kiyosuke, T. & Arita, M. (1996). Openings of cardiac KATP channel by oxygen free radicals produced by xanthine oxidase reaction. *Am J Physiol* 271, H478-489.

Totter, J. R. (1980). Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1763-1767.

Vogalis, F., Hegg, C. C., & Lucero M. T. (2005). Ionic conductances in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium. *J Physiol.*, 562.3, 785-799.

Wang, G. K., Wang, S. Y. (2002). Modifications of human cardiac sodium channel gating by UVA light. *J Membrane Biol.*, 189, 153-165.

Weisiger, R. A. and Fridovich, I. (1973). Mitochondrial superoxide dismutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.*, 248, 4793-4796.

Wildman, M., Ott, S. R., & Burrows, M. (2002). GABA-like immunoreactivity in nonspiking interneurons of the locust metathoracic ganglion. *J Exp Biol*, 205, 3651-3659.

大坪義孝 (2002) マウス茸状乳頭味蕾における味蕾細胞間相互作用 九州工業大学 学位論文

参考図書

Bertil Hille (2001) Ion channels of excitable membranes. Third Edition. Sinauer Associates, Inc.

大柳善彦 (1989) 活性酸素と病気 化学同人

谷口直之監修、藤井順逸、鈴木敬一郎編 (1996) 活性酸素Q & A 医薬ジャーナル社

勝部幸輝、谷口直之編 (1990) SODの新知見-構造、機能と診断、治療へのかかわり メディカルトリビューン

山根恒夫 (1980) 生物反応工学 産業図書

謝辞

本研究および論文作成にあたり、熱心に御指導下さった吉井清哲教授に心より感謝いたします。本研究、論文作成に多大なる協力を頂いた大坪義孝博士を始めとする研究室の皆様にも心から感謝いたします。最後に、私を育て、絶えず応援し続けてくれた家族に感謝します。