

### 9738 ナトリウムチャンネル及びカリウムチャンネルの開閉過程に対する 溶媒環境の影響

助成研究者：久木田 文夫 (岡崎国立共同研究機構 生理学研究所)

共同研究者：中西 圭子 (愛知県身障者コーン・発達障害研究所)

ナトリウムチャンネルやカリウムチャンネルは神経や脳で活動電位を発生する典型的な膜電位依存性イオンチャンネルである。これらのイオンチャンネルのキネティクスは様々な角度から研究されてきたが、溶媒との関連での研究は多くない。従って、これらのイオンチャンネルのゲート機構に対する溶媒や水の影響の分子的機構は明らかでない。本研究ではタンパク質一般の構造変化のダイナミクスという視点で、溶媒効果を定量的に解析した。この方法はイオンチャンネルの膜電位依存性構造変化の実体を推察するのに有用である。

ナトリウムチャンネルのゲート機構に対する溶媒効果を細胞内灌流したイカ巨大神経線維を用いて解析した。軸索膜両端の浸透圧を均衡させ、溶液の浸透圧や粘性を増加させるために軸索膜の両側の溶液に同じ量の非電解質を加えた。

非電解質の濃度が増加するとゲート電流の時間経過は緩やかになった。ゲート電流の指数関数的な減衰の時定数  $t_g$  は溶液の浸透圧或いは溶液の粘性の関数で表せる。ナトリウムチャンネルのイオン電流 (Na 電流) に対する溶媒効果と比較すると、ゲート電流に対する溶媒効果は幾分小さいが、単純に粘性効果として説明できる。溶媒がキネティクスに影響を与えることの主たる理由はナトリウムチャンネルタンパク質のフレキシブルな構造に由来する。ナトリウムチャンネルの基本的な構造は脂質二重相膜とその水界面で保持されているため、ナトリウムチャンネルは基本構造を変えずに、その水溶性部分は自由に溶媒と相互作用出来る。溶媒と相互作用する水溶性部分は、イオンチャンネルの基本的な性質 (膜電位依存性及びイオン選択性) は変えずに、イオンチャンネルの全体の構造変化の速度を決定する。

ゲート電流と Na 電流に対する溶媒効果の違いは、ゲート電流が流れてからイオン電流が流れるまでの過程「開過程最終転移」の性質に由来している。この最終転移はゲート電流を伴う閉から閉への転移より温度依存性が低く溶媒依存性が大きい。このことは最終転移はタンパク質セグメントや側鎖、イオンや溶媒の再配置を伴う過程で、それに先立つ過程より小さな活性化エンタルピーをもつ過程と思われる。



## 9738 ナトリウムチャンネル及びカリウムチャンネルの開閉過程に対する 溶媒環境の影響

助成研究者：久木田 文夫（岡崎国立共同研究機構 生理学研究所）  
共同研究者：中西 圭子（愛知県身障者コーン・発達障害研究所）

### ① 研究目的

神経インパルス伝搬の主役であるナトリウムチャンネルやカリウムチャンネルは、電位差により機能を制御される膜タンパク質である。これらのイオンチャンネルはナトリウムやカリウムなどの電解質を選択的に透過し、膜電位変化を神経線維上に伝搬する電気的なスイッチ機能を担う分子機械である（文献1、2、3）。この分子機械は脂質二重層膜に保持されており、一般的には脂質との相互作用が重要視されてきたが、現実には脂質に埋没した部分はほんの一部であり、多くの部分は水溶液に面している。本研究ではこれらの分子機械の働く場としての溶液環境に注目し、「水」などの溶媒の性質が膜タンパク質分子機械の機能、つまり生理機能に及ぼす影響を検討する。

イオンチャンネルの機能にとって必須のナトリウムやカリウムのなどの電解質は溶媒である「水」によりイオンとなり様々な生理的作用を演じているが、イオンチャンネルでは電気現象を引き起こす主役である。一方、イオンが作用する細胞、膜タンパク質や酵素を主体として眺めると、これらが機能するための場を提供しているのは水と電解質である。イオンチャンネルのような膜タンパク質では脂質膜がその場と考えられるのが通例である。しかし、本研究で注目したのはイオンチャンネルの機能、特にその時間経過に対する「水」及び親水性溶媒の効果である。一見、パラドックスに見えるこのテーマは、次のような考察により理解できる。1) 水溶性タンパク質では「水」や電解質溶液はタンパク質の高次構造を安定させるために必須であり、水・溶媒の効果は直ちに水溶性タンパク質の安定性に影響を及ぼす。又、水溶性タンパク質は親水性の部分溶液側に露出して安定している。2) 膜タンパク質の構造を決めているのは脂質二重層膜である。水・溶媒は脂質二重層膜を形成させるために必要で、膜タンパク質の高次構造を決定しているのは脂質二重層膜及びその電解質溶液との界面のある。従って、水溶性溶媒は膜タンパク質の高次構造そのものに影響を与えずに、その機能を修飾することが期待できる。本研究では、水に加えた非電解質の溶媒としての効果を調べることにより、「水」の役割の一面を解明することを目的とする。

この研究はイオンチャンネルの開閉のダイナミクスが膜脂質ではなく、イオンの溶けている溶媒の性質で決まるという独創的な研究（文献4）であり、イオンチャンネルタンパク質の構造変化が水溶性タンパク質とも共通する原理のもとで行われていることが示され、今後の発展が期待できる。

## ② 研究方法

1) 細胞内灌流したイカ巨大神経線維を用いて、細胞内外の溶液の浸透圧を同時に交換して、溶液の浸透圧差による膜を介し水の流れに依存した現象やそれに付随した膜の力学的な変形の効果を最小限に押さえた（文献5，6）。つまり、測定される変化はイオンチャンネルタンパク質自体に対する溶媒の作用で、膜自身は膜タンパク質を保持すること及び電気的な測定を可能にする条件を提供しているに過ぎない。データの取り込みや処理は既報（文献4，文献7）に記述したとおり行った。

2) 電気的な測定はナトリウムチャンネルに対して行った。ナトリウムチャンネルが膜電位（脂質膜両端の電位差でナトリウムチャンネルの電荷に作用する）を感じる部位である電位センサーの動き（ゲート電流）の測定及びナトリウムチャンネルを通るナトリウムイオンにより運ばれる電荷の測定（Na電流の測定）とを行う。両者ともナトリウムチャンネルタンパク質の構造変化を示しているが、それぞれ、タンパク質内の特定の電荷を持った構造の動きとして捉えることと、ナトリウムチャンネルタンパク質が構造変化した結果現れた、ポア（イオンチャンネル細孔）をNaイオンをプローブとして、測定することに相当している。ゲート電流はNa電流に時間的に先んじて現れる。この電流はナトリウムチャンネルにフグ毒を作用させ、ポアを塞ぎ、Naイオンは、大きなイオン（塩化テトラアンモニウムイオン）に置き換えてNa電流が全く流れない条件で測定する。

3) 溶媒を変化させるために、膜タンパク質の機能を損なわないために毒性のない、多価アルコールや糖を電解質に加えた。多価アルコールや糖を加えたために変化する溶媒の性質を表す指標として、電解質溶液の浸透圧と粘性を用いた。時間経過の変化をこれらの物理量に対する関数としてプロットすることがデータ解析の一步である。

4) 温度はゲート電流やNa電流の時間経過に影響を与えるが、両者の温度依存性を測定し、溶媒効果の温度依存性を詳しく調べる。温度の制御を精度良く行えるように装置を改良し、温度変化を小刻みに行き、熱力学的な解析の精度を挙げた。

5) ゲート電流を伴う膜電位に依存し確率的に起こる構造変化が終わった時点でも、ナトリウムチャンネルのポアはNaイオンが流れる状態にない。もう一過程あることはホジキン・ハックスリ以来考えられてきた。これは「開過程最終転移」と呼ばれる。この過程を直接調べることは難しいが、ゲート電流とNa電流が溶媒や温度などで変化する様子を正確に測定すると、簡単なモデルなどの手助けで「開過程最終転移」の性質を記述できる。

6) 分子量の異なる多価アルコールや糖を用いて、溶媒効果を調べる。溶媒効果は浸透圧効果と粘性効果（分子量依存性がない）が不可分に結びついているが、効果の現れ方で開過程の律速段階の分子機構を推測できる。

7) 最近、数多く出ている一次構造のデータをもとに、分子グラフィクスなどの手助けにより、分子構造に立脚した、溶媒効果の概念を構築する。

## ③ 研究結果

ゲート電流の時間経過は溶液のグルコースの濃度が増加すると緩やかになる（図1 A-E）。グルコースの効果は膜電位に依らず現れる（図1 a-d）。時間経過の時定数  $t_g$  は膜電位に対してベル型の曲線を示す（図2 A）が、グルコース濃度の増加に伴う時定数  $t_g$  の増大は測定する膜電位に依存しない（図1 B）。すなわち、グルコースは膜電位依存性というナトリウムチャンネルの最も重要な性質には影響しない。ゲート電流を伴う構造変化（ゲート電流を時間積分した  $Q_g$  で表す）の膜電位依存性（ $Q_g - V$  曲線）は変化せず、 $Q_g$  の最大値も変化しない（図1 C）。グルコース添加により、膜電位変化で開くナトリウムチャンネルの総数は変化しないことを示す。Na 電流の測定から求められるナトリウムチャンネルのコンダクタンスの膜電位依存性（ $g_{Na} - V$  曲線、図2 C右下挿入）は  $Q_g - V$  曲線より全体として脱分極方向へずれている。グルコース添加により膜電位依存性は変化しないがナトリウムチャンネルのコンダクタンスは減少している。膜電位依存性の性質自体は変化せず、コンダクタンスの絶対値のみが減少することを意味している。これは単位イオンチャンネルコンダクタンスの減少より単位時間に開いているイオンチャンネル数が減少していることが大きな原因である。 $Q_g - V$  曲線が  $g_{Na} - V$  曲線より過分極方向にずれているのは、ゲート電流は閉状態間の転移でも流れ、最終的に開状態になるナトリウムチャンネルは膜電位が  $-30 \text{ mV}$  以下ではごく一部であることを示している。

ゲート電流の時間経過の変化を分子量の異なる3種類の非電解質（エリスリトール、グルコース及び蔗糖）を加えて調べた。理論な考察より、時間経過の変化は浸透圧に対しても式（1）（図3上）のような関係がある。実験データは3種類の非電解質で別々の直線上に乗っている（図3 A）。つまり  $\beta$  の値は分子量が大きい程大きい。 $\beta$  の膜電位依存性は小さい（図3 C）。溶液の粘性に対しては式（2）（図3上）のような関係式で表せる。3種類の非電解質ではほぼ同じ直線上に乗っている（図3 A）になる。膜電位や非電解質の分子量に依らず、同じ程度の値の  $\alpha$  が求められる（図3 D）。

典型的な粘性効果は分子種によらないはずであるが、ゲート電流の場合はNa 電流に比べ、より典型的な粘性効果が現れる。Na 電流に対する溶媒効果の解析は既に報告している（文献4）が、Na 電流に対する溶媒効果はゲート電流に対する溶媒効果より大きい、特に分子量が小さいほどその傾向にある。ゲート電流の  $\alpha$  の値はNa 電流の  $\alpha$  の値の56～71%で、 $\beta$  の値は62～87%である。ゲート電流の時間経過は典型的に粘性依存性の構造変化を示し、Na 電流では粘性依存性と浸透圧依存性が共存しているとも考えられる。両者の違いは、「開過程最終転移」の性質に依存している。結論としては「開過程最終転移」はゲート電流で測定されるゲート機構での構造変化より溶媒依存性特に浸透圧・水和の関与が大きいことが示唆される。

温度依存性の測定により、溶媒効果は膜電位依存性や活性化自由エネルギー  $\Delta H^\ddagger$  に影響を与えず、活性化自由エネルギー  $\Delta S^\ddagger$  が変化することを示している。温度依存性を定

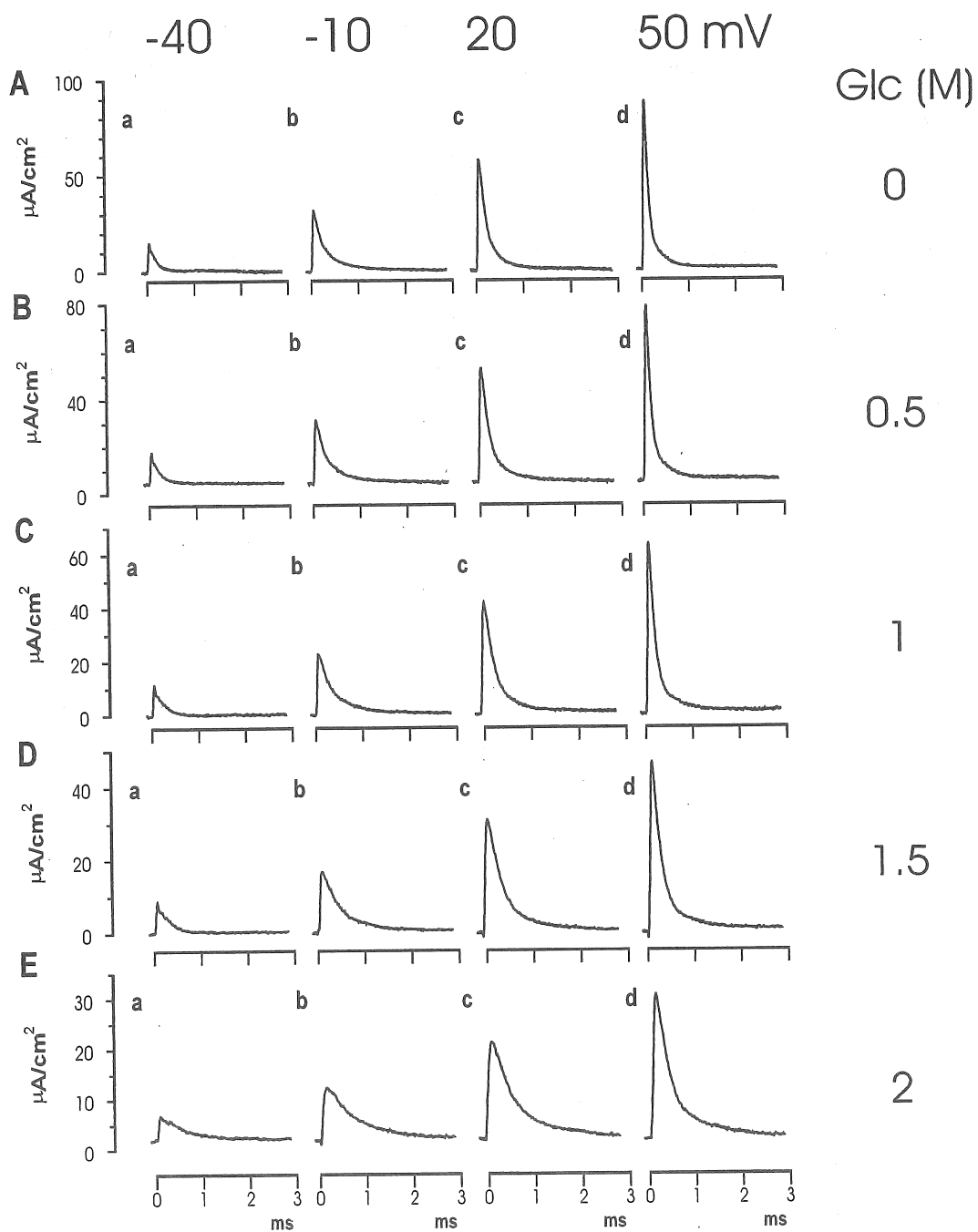
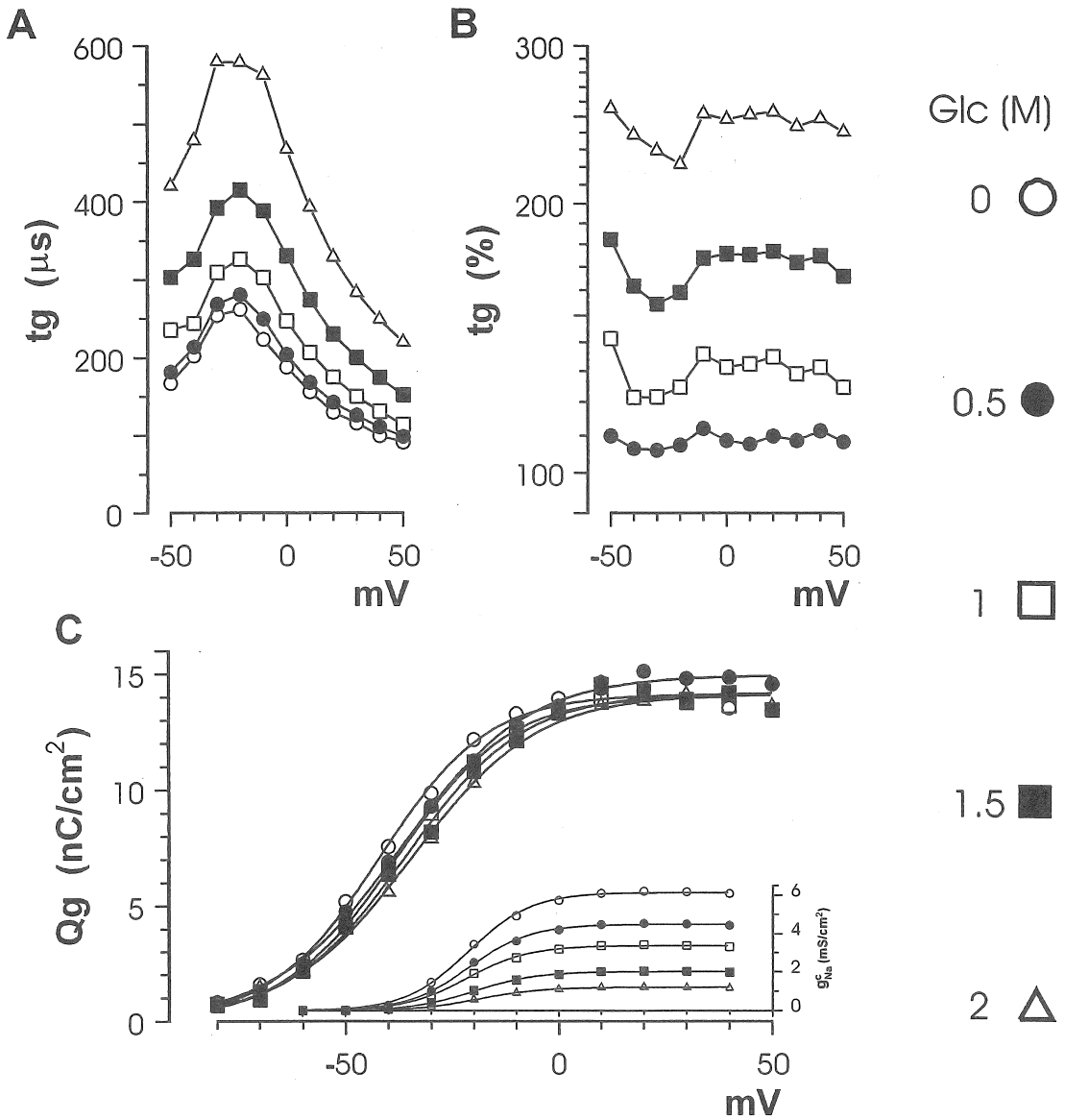


Fig.1 Traces of gating currents at different membrane potentials and glucose concentrations.



**Fig.2** Effects of glucose on a time course and a voltage-dependence of gating current  
**A.** Decay time constants  $t_g$  of the gating current are plotted as a function of membrane potentials at different glucose concentrations.  
**B.** Percentage changes of  $t_g$  are plotted as a function of membrane potentials at different glucose concentrations.  
**C.** Total charges  $Q_g$  carried with gating current are plotted as a function of membrane potential ( $Q_g$ -V curve) at different glucose concentrations. Sodium conductances on the right-hand ordinate are plotted as a function of membrane potential ( $g_{Na}$ -V curve).

(eq.1)

$$\frac{t_g}{t_{g0}} = \exp(\beta \cdot (\Pi - \Pi_0))$$

(eq.2)

$$\frac{t_g}{t_{g0}} = \alpha \cdot \left( \left( \frac{\eta}{\eta_0} \right) - 1 \right) + 100$$

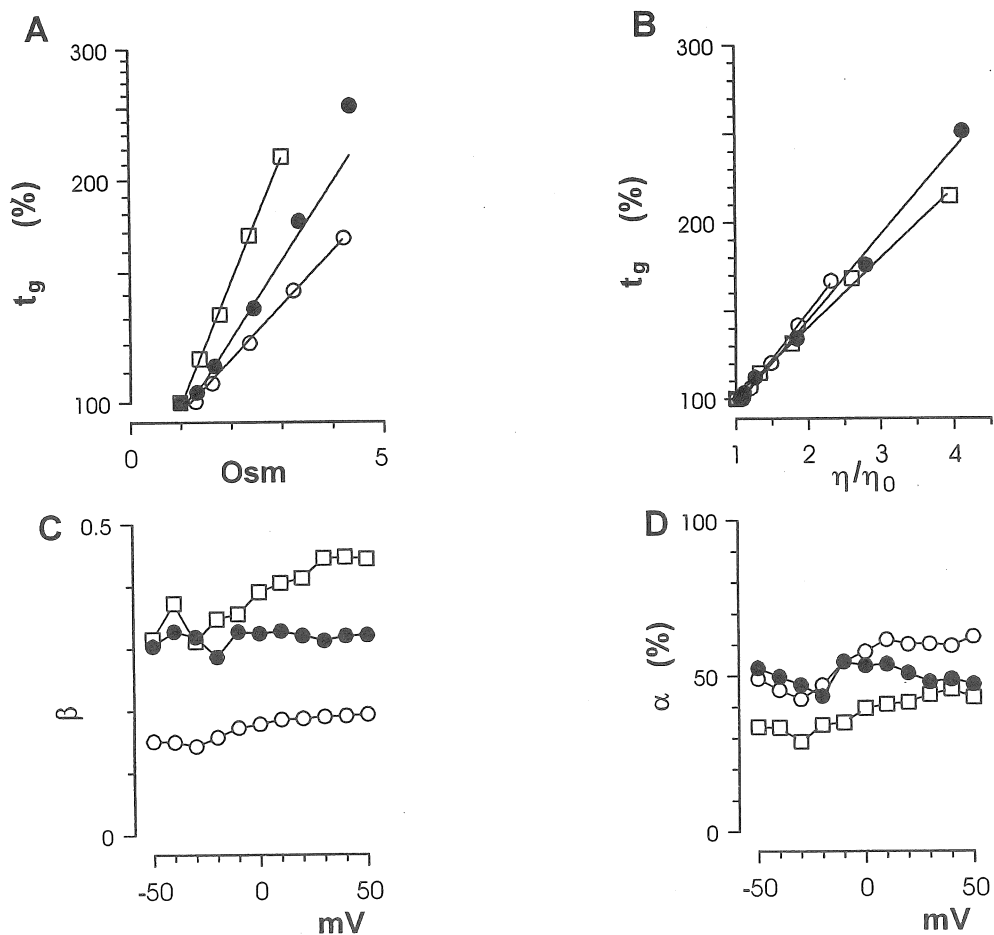


Fig.3 Solvent effects are expressed as a function of osmolarity and viscosity.

Data are obtained with erythritol(○), glucose(●) and sucrose(□).

- A. Percentage change of  $t_g$  is plotted as function of osmolarity and is fitted with eq.1.
- B. Percentage change of  $t_g$  is plotted as a function of viscosity and is fitted with eq.2.
- C. Values of  $\beta$  are plotted as a function of membrane potentials.
- D. Values of  $\alpha$  are plotted as a function of membrane potentials.



量的に測定すると、ゲート電流の時間経過の温度依存性が、Na電流の時間経過の温度依存性よりやや大きいことが明らかになった。このことは最終転移の律速段階にはタンパク質側鎖や水・溶媒及びイオンの再配置が重要や役割を果たし、活性化自由エネルギー $\Delta H^\ddagger$ のより小さな構造変化が主体となっていることが窺える。

#### ④ 考察

ナトリウムチャネルの膜電位依存性の構造変化の速度は、溶媒に依存することが実験的に示された。これは、ナトリウムチャネルタンパク質が水溶液に露出した部分の大きいことと、この水溶液に露出した部分の構造変化が膜タンパク質全体の構造変化の速度を決定していることを意味している。ナトリウムチャネルを用いて、このような溶媒依存性の律速段階の典型的な例を示すことが出来た。このようなデータは水溶性タンパク質を含む全タンパク質でも数多くはない。イオンチャネルタンパク質特有の電氣的測定がその定量性を高めているためであると思われる。

場としての脂質二重相膜の関与については、ナトリウムチャネルに対するアルコールの作用を調べた（文献8，9）が、溶媒効果とは性質が異なっている。アルコールは脂質に溶解込み、脂質膜に対するアルコールの分配係数に逆比例した濃度で有効にナトリウムチャネルの機能を抑える。更に膜電位依存性を脱分極側にシフトさせるが、時間経過などには変化はない。低濃度では可逆的な麻酔作用を示し、高濃度では不可逆的な変性を起こす。つまり、脂質二重相膜内部の環境を変化させようとする、ナトリウムチャネルの構造自体が大きな影響を受けることを示している。

実際の分子構造に照らし合わせて考えると、膜タンパク質の構造には大きな自由度があり、水・溶媒と相互作用は膜タンパク質の基本的な性質は変えないが、その構造変化の速度には影響すると思われる。一方では厳密なイオン選択性を説明する為には、大きさや性質が厳密に決まっていたいわゆる固い構造の方が有利のように思える。しかし、もともとこれらの説明自体が、自由エネルギーを中心とした、スタティックな考え方から導出された概念であり、現実にはダイナミックな分子の相互作用の集大成としてスタティックな性質も説明出来るので、柔らかい構造モデルと矛盾しない。又、X線構造解析や電子顕微鏡による方法で得られるイオンチャネルタンパク質の構造は、揺らぎの大きな構造の時間平均的構造ないしは有る状態に強制的にフリーズした状態を示すに過ぎない。粘性効果を説明する柔らかい構造モデルはナノ秒程度の速い動きの集大成として、数百マイクロ秒のイオンチャネルの構造変化を説明しようと言う試み（文献4）で、X線構造解析や電子顕微鏡によるイオンチャネルタンパク質の構造解析より得られる情報と相補的な情報である。

⑤ 今後の課題

イオンチャネルの一次構造はナトリウムチャネルをはじめとして殆どの生理的に重要なイオンチャネルで明らかにされている。次の期待されるのは、X線結晶構造解析によるイオンチャネルの立体構造が明らかにされることである。最近、カリウムチャネルのポア部分に相当する構造が解明された。これはバクテリアのカリウムチャネルが高等動物のカリウムチャネルと同じ一次構造を持ち、特異的な神経毒の結合部位の構造が同じであることを確認した上で、カリウムチャネルタンパク質を多量に精製し、結晶化に成功したことによる。もともとナトリウムチャネルのような巨大な分子のX線結晶構造解析には更に多くの時間がかかると思われる。現在、溶媒効果の実験の出来る標本(イカ巨大神経線維)と、結晶化出来る純粋のイオンチャネルタンパク質(バクテリアのカリウムチャネル)の間には大きなギャップがあるが、これを解消すべく、有効な遺伝子発現系を開発する努力は必要である。両者のギャップは近い将来に埋められるであろうし、長時間の平均的な構造であるX線結晶構造解析による立体構造を基礎とした、溶媒効果の取り扱いも可能になるろう。

⑥ 文献

- 1) 久木田文夫  
細胞電気信号の発生機構  
「ニューバイオフィジックス 8巻 脳・神経システムの数理モデル」  
臼井史朗編 共立出版 pp14-28, (1997)
- 2) 久木田文夫 老木成稔 岡田泰伸  
序論 イオンチャネル  
「パッチクランプ実験技術法」 岡田泰伸編 吉岡書店 pp1-9. (1996)
- 3) 久木田文夫  
膜電位変化とイオンチャネル  
「生命科学の基礎 6 生体膜の分子素子・分子機械」  
日本生物物理学会編 学会出版センター pp241-264. (1990)
- 4) **Kukita,F.** (1997)  
Solvent-dependent rate-limiting steps in the conformational change of sodium channel gating in squid giant axon. *J.Physiol.(Lond)* 498, 109-133.
- 5) 久木田文夫  
ジャイアントアクソン  
「膜学実験シリーズ 第一巻 生体膜編」  
日本膜学会編 共立出版 pp98-103. (1994)
- 6) 久木田文夫  
膜電位固定法  
「膜学実験シリーズ 第一巻 生体膜編」  
日本膜学会編 共立出版 pp353-358. (1994)
- 7) 久木田文夫  
パソコンによりデータ処理技術「専用ディジタイザー APC204 と NEC システム」  
日本生理学雑誌、4、(1998)
- 8) **Kukita,F., Mitaku,S.**  
Kinetic analysis of the denaturation process of the sodium channels in squid giant axons by alcohol. *J.Physiol.(Lond.)* 463, 523 - 543. (1993)
- 9) Mitaku,S., Suzuki,K., Odashima,S.,Ikuta,K.,Suwa,M., **Kukita,F.**, Ishikawa,M., Itoh, H.  
Interaction stabilizing tertiary structure of bacteriorhodopsin studied by denaturation experiments. *Proteins. Structure, Function and Genetics.* 22, 350-362. (1995)

## Solvents affect the gating kinetics of sodium and potassium channels.

Fumio Kukita (National Institute for Physiological Science, ONRI)

Keiko Nakanishi (Institute for Developmental Research, Aichi Human service Center)

### Summary

Sodium channels and potassium channels are typical voltage-gated ionic channels for a generation of action potentials in nerve and brain. Kinetics of these ionic channels has been extensively studied, but has not been mentioned so much in relation with solvents. So, a molecular mechanism of effects of solvent and water on the gating process of these ionic channels is not clear. It is helpful to imagine a voltage-dependent conformational change in these ion channels, if these effects are qualitatively analysed at a viewpoint of dynamics in protein conformational change.

Solvent effects on a gating process of sodium channels were analysed, using an intracellularly perfused squid giant axon. The same amount of nonelectrolyte was added on both sides of axolemma in order to change a solution osmolality and/or viscosity, keeping an osmotic balance across the axolemma.

The time course of gating current was slowed as a nonelectrolyte concentration increased. The change of a time constant  $t_g$  is expressed as a function of osmolality or viscosity of solutions. Comparing with solvent effects on sodium currents, effects on gating current are smaller but are simply explained by a viscosity effect. The main reason that solvent affects the kinetics is attributed to a flexible structure of the sodium channel proteins. Sodium channels have a lot of hydrophilic structure interacting with solvents and determining the rate-limiting step of overall conformational change of ionic channels, because a basic structure of sodium channels is maintained in the lipid bilayer and the interface of water and lipids.

A difference between effects on the gating current and those on sodium current was clear and might show a characteristic of a final transition to an open state. As expected from a lower temperature dependence of this transition, this transition may be attributed with a rearrangement of protein segments and side chains, ions and solvents among states separated with a smaller activation enthalpy than those in a previous process accompanying a gating current.