

Title	ゾウリムシのイオン環境適応に伴うCa及びKチャンネルの変化
Author(s)	岡, 剛史
Citation	大阪大学, 1983, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/575
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

ゾウリムシのイオン環境適応に伴う

Ca及びKチャネルの変化

岡 剛 史

(大阪大学大学院基礎工学研究科)

1983年 2月

Changes of Calcium and Potassium Channels during
Adaptation to Ionic Solution in Paramecium.

by

TAKASHI OKA

Department of Biophysical Engineering

Faculty of Engineering Science

Osaka University

This paper has been submitted in partial fulfillment of
the requirements for the Degree of Doctor of Engineering
at Osaka University

Thesis supervisor; Professor Fumio Oosawa

February 1983

目 次

	頁
要 旨	1
第一章 序 論	
§ 1 緒 言	3
§ 2 生物の環境適応研究の現状	4
§ 3 リウリムシ行動研究の到達点	7
第二章 材 料 及 び 方 法	
§ 1 材 料	11
§ 2 行動解析の方法	11
§ 3 電気生理学的実験の方法	12
§ 4 細胞内イオン濃度の測定	14
§ 5 電気泳動的細胞微小注射	15
第三章 リウリムシのイオン環境に対する恒膜電位適応	
§ 1 緒 言	16
§ 2 実 験 結 果	
2-a 行動学的環境適応	16
2-b K^+ 濃度変化に対する適応に伴う膜電位 変化	21
2-c 環境適応に伴う $[K^+]_i$ の変化	25
§ 3 考 察	32
第四章 膜電位振動現象と遊泳速度の調節	
§ 1 緒 言	39
§ 2 実 験 結 果	
2-a 環境適応と膜電位振動現象	40
2-b 膜電位振動時の膜の性質	42
§ 3 考 察	45

第五章	環境適応に伴う膜の興奮性の変化	
§1	緒言	46
§2	実験結果	
2-a	行動学的環境適応	48
2-b	膜電位固定法による環境適応の解析	49
2-b-1	環境適応にともなうI-V曲線の変化	49
2-b-2	Ca ²⁺ チャンネルの不活性化とその回復	53
2-b-3	Ca ²⁺ チャンネルの電位依存性不活性化とCa ²⁺ 依存性不活性化	55
1)	Ca ²⁺ チャンネルの不活性化の時間経過	56
2)	EGTA 微小注射の効果	59
2-b-4	K ⁺ チャンネルによるCa ²⁺ 電流の調節	63
2-c	K ⁺ 耐性変異株の興奮性とK ⁺ イオン耐性	68
§3	考察	72
第六章	結び	76
謝辞		78
引用文献		79

要 旨

生物は、さまざまな環境変化に対し反応し、新しい環境に適応して恒常性を維持している。これは生命維持のための基本的能力の一つである。一個体内で起こる生理的な適応現象の分子レベルでのメカニズムについては、現在ほとんどわかっていない。本論文では原生動物ゾウリムシを用い、その行動にみられる適応現象を興奮性 Ca^{2+} チャンネル及び K^{+} チャンネルの活性の調節という面からとらえ、電気生理学的手法を用いて研究を行ない、次の事を明らかにした。

- 1) 外液の K^{+} 濃度を適応した値より低くするとゾウリムシはその遊泳速度が加速した状態になる。しかし2~3時間後には、新しい液に適応し定常速度にもとる。この適応の過程で、適応液中での静止電位が一定となる向きに変化している。これは K^{+} 濃度が高くあるいは低くなるとそれに対応して K^{+} コンダクタンスが適応とともに増大あるいは減少するためである。また外液 Ca^{2+} 濃度を高くしたときも加速の遊泳を行なうが、やはり適応とともに静止電位が一定になる向きに変化する。
- 2) 外液 K^{+} 濃度を減少させるか Ca^{2+} 濃度を上昇させて加速の条件にした時、しばしば過分極性膜電位振動現象がおこる。振動中に膜電位固定を行ない電流-電圧関係を調べると過分極側で特徴的な Ca^{2+} 依存性の外向電流が流れる。
- 3) 1) 2) の事実から外液 K^{+} 濃度の減少あるいは Ca^{2+} 濃度の増加に伴う少量の Ca^{2+} の一時的流入が泳ぎの一時的加速の原因になっていると考えられる。この考えは、ゾウリムシの洗剤処理モデルによる実験によって支持された。

- 4) 高濃度の K^+ 溶液中 (K^+ 刺激) での後退遊泳の持続時間を測定する方法で膜の興奮性を調べると、適応溶液の K^+ 濃度によって興奮性が異なり、外液 K^+ 濃度を変えたとき興奮性について適応現象がおこる。
- 5) この過程を膜電位固定法で調べると、外液 K^+ 濃度を上昇させると Ca^{2+} の内向電流が抑制され、適応が進むとこの電流の回復がみられた。すなわち Ca^{2+} チャンネルの不活性化の程度が適応している溶液に応じて変化する。なお EGTA 微量注射によると、この不活性化は細胞内 Ca^{2+} の存在には依存しない。
- 6) 適応 K^+ 濃度を 2mM から 8mM に上昇させると、電位依存性 K^+ チャンネルの活性化の時定数が 0.5ms から 4ms へと変化する。これにより、興奮時の Ca^{2+} 流入量が調節される。このように興奮性についての適応には Ca^{2+} 、 K^+ 両チャンネルの変化が関与している。
- 7) K^+ イオン耐性株は、静止電位の K^+ 濃度依存性が小さいため高濃度の K^+ 溶液中でも静止電位がみずかしく脱分極しない。そのため Ca^{2+} チャンネルの不活性化があまり起こらず、高濃度の K^+ 溶液中でも興奮性を維持できる。

第一章 序 論

§1 緒 言

現在の宇宙は今から約150億年前のビッグバンにより形成されたと言われる。素粒子から始まるその歴史は約46億年前の地球の形成、約40億年前の生命の誕生へと連なっていく。その長い歴史を経て誕生した生命は環境の影響を受けながら、また環境を変化させながら進化してきたと考えられる。地球環境は1秒、1時間、1日、1年、10年…と様々な時間スケールで常に変動しており、生命はその環境変化に対し、様々な形で適応することによって自己の存在を維持している。そのために環境変化を感知する感覚器官、そこから入る情報を処理する情報変換器として環境変化に対し応答する運動器官等を高度に発達させながら環境適応を行っている。この適応能力は生命維持の最も基本的な能力の一つである。この適応のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目標に本研究を行った。

なぜ分子レベルなのか、それは、生命にとって基本的機能であればある程、分子レベルでそのメカニズムが働いているに違いないと期待するからである。そして分子レベルでの基本的メカニズムは、生物種を問わず一般性があると期待するからである。このような分子生物学の思想による最も華々しい成果は分子遺伝学的发展である。遺伝子の本体であるDNAの構造と遺伝のメカニズムの解明がバクテリオファージを用いて行なわれた事はあまりにも有名である。

我々は、環境適応の機構を解明するために、真核生物の中で最も下等と言われる原生動物のゾウリムシを材料として選んだ。それは単純な生物こそは、基本的機能を最も凝縮した形で、保持していると期待したからである。ここで述べる研究は、行動に観られる適応現象を興奮性チャネルの活性の調節という側面から解明しようとして試みたものである。

このような基礎的研究は、現代の環境問題に対し、直接何らかの展望を示すものではない。しかし、このような基礎的研究の無数の集積の中で、100年先、200年先を展望する様な人類と自然環境との調和的發展に関する思想が形成されると期待される。ここに述べられる小さな研究がそのための無数の礎の一つになれば幸いである。

§2. 生物の環境適応研究の現状

環境適応 (environmental adaptation) とは生物がその環境において生存に適した構造や機能を持っていることであり、又、環境の変化に対し、代謝機能を調節し、恒常性を維持する過程である。一般にこの過程は、Fig 1 の様に表現できる。すなわち、様々な環境変化を、外界の刺激として、感覚受容器を通じて感受し、それを情報変換し、運動器を制御するとともに、情報を受容器又は情報変換経路にフィードバックする。そして代謝機能の恒常性を維持する。

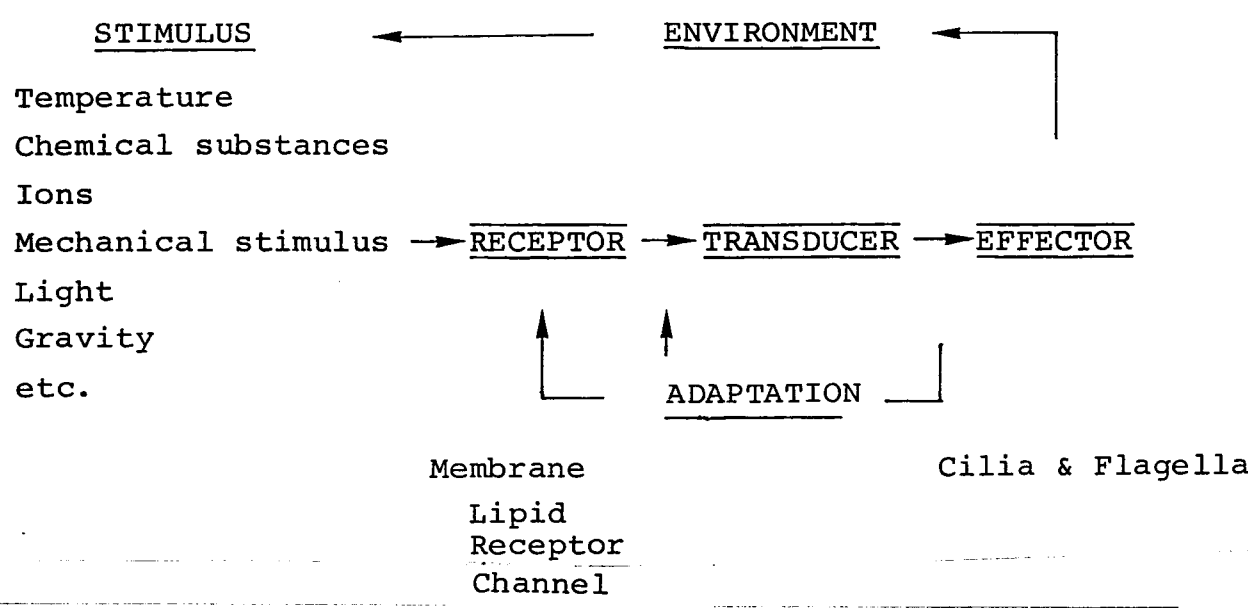


Fig 1: 生物の環境変化に対する反応(行動, 適応)を示す模式図

この適応現象については、様々なレベルで研究が行われている。系統発生の間におきた中、くりした生存の機会を増やす様な又、適合性を増す様な変化は進化的適応 (evolutional adaptation) と呼ばれ、解剖学的研究の他に、比較生化学的に、代謝経路あるいは機能が生存環境の変化によつてどの様に変化しているかよく調べられている。(Hochachika 1973)

この様な種の間でみられる現象の他に、一個体でみられる生理学的適応 (physiological adaptation) には順化 (acclimation) と呼ばれる新しい環境に数日から数週間かけて適応する過程と即時的適応 (immediate adaptation) と呼ばれる短期の調節作用がある。これらの変化は可逆的である。前者には、高山適応における赤血球増や、温度適応における酵素反応速度の温度依存性の変化等が知られている。後者には潮間帯での動物の酸素不足に対する呼吸から

解糖への切りかえや、水中でアンモニア排出をしていた動物が乾燥状態になると尿素排出に切り変わる例等が知られている。

又、行動的適応も適応の一様式として重要である。ストレス要因を避け居場所を変え、防護物を求めの姿勢や運動形態を変えるなど様々な行動を介して環境変化に適応する。この過程は、生理的反応で調節される範囲とこえる環境変化に対し、うまく耐えうる場所を見つける事により適応の可能性を大きく広げている。

この様な生理的適応の分子レベルでのメカニズムは次の様なものが知られている。その一つは恒流動性適応 (homeoviscous adaptation) と呼ばれる生体膜脂質の流動性を一定の範囲内に保つ適応である。これは、大腸菌 (Marr & Ingram 1962, Sinensky 1974) や原生動物のオトラヒメナ (Nozawa et al. 1978) を用いた温度適応でよく調べられており、脂質の中でもリン脂質アシル基の修飾が顕著であることがわかっている。すなわち低温培養では不飽和脂肪酸が増え、膜の流動性が上昇し、高温培養では、飽和脂肪酸が増え、流動性が下降する結果、培養温度に於ける流動性が一定に保たれる様に適応している事が明らかにされている。しかし、この様な脂質の変化が行動とどのような形で結びついているかは明らかではない。

また、大腸菌ではメチル基受容走化性蛋白 MCP (methyl-accepting chemotactic protein) のメチル化が走化性反応と適応過程とに中心的役割を果たしていることが知られている。(Kort et al. 1975, Parkinson 1977) 一方アムフラシ (Aplysia) ではシナプスに於ける情報伝達の調節と適応が cAMP 依存性の protein kinase による K^+ チャネルのリン酸化により起こることが示唆されている。(Castellucci et al. 1980, Klin & Kandel 1980)

ゾウリムシに於いて観察される行動的適応の現象が膜のどのような電気的性質の変化によつて引き起こされているのか興奮性チャネルの活性の調節という面からのアプローチは未だ試みられていない。本研究はこの様な方向から適応のメカニズムを明らかにする事を目的として電気生理学的手法を用いて実験を行った。

§ 3. ゾウリムシの行動研究の到達点

3-a ゾウリムシの特徴

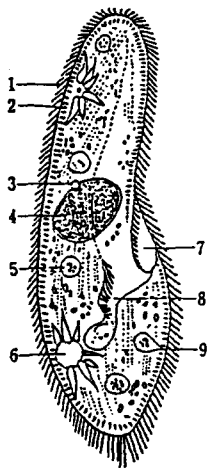


Fig 2

ゾウリムシの一般形態
 1: 繊毛, 2: 毛胞,
 3: 小核, 4: 大核,
 5: 食胞, 6: 収縮胞,
 7: 口部, 8: 食道部,
 9: 肛門孔
 (「生物の実験法」石田, 佐藤編より).

ゾウリムシは原生動物の中でテトラヒメナと並んで最もよく研究されている単細胞生物の一つである。その大きさは、*Paramecium caudatum* の場合長さ約 $200\mu\text{m}$ 巾約 $50\mu\text{m}$ であり Fig 2 に示す様な形態をしている。

ゾウリムシの研究材料としての特徴としては次の8点が考えられる。まず細菌の場合と同様に遺伝的にも生理的にも均一なクローン培養ができ、細胞を大量に集めることができる。又、細胞分離法が確立しているため生化学的実験が可能である。

次に突然変異株の誘導が高等生物よりも容易である。また繊毛運動と膜の機能が

密接に結びついているため行動をマーカーに膜の突然変異株を分離同定することが容易である。

オ3に ガラス管微小電極を刺入することが可能であるので膜の電気現象と行動の発現調節の機構とのつながりを研究する系として優れている。又、一般興奮性細胞の膜電気現象と基本的には共通のメカニズムを持つ (Naitoh & Eckert 1968) ことが明らかにされており、

『動く神経細胞』という異名を持つ様に高等生物の神経興奮、感覚受容のモデル系として用いることができる。

オ4に、興奮性 Ca^{++} チャンネルが繊毛に局在していることが明らかにされており (Dunlap 1977) 繊毛を除去した後の回復過程でチャンネルの再生やチャンネルタンパクの膜への植のこみの過程を調べるモデル系として用いることができる。一方、細胞体にあるチャンネルの性質のみを調べることもできる。

オ5に 界面活性剤 Triton X-100 で処理したゾウリムシは膜の選択的透過性のみが失われており、細胞内イオン環境を自由にコントロールでき、細胞内情報変換系、運動系を調べるすぐれたモデル系として用いられる。

オ6に 繊毛内の Ca^{++} 濃度に対して非常に敏感に、繊毛打が変化するため、繊毛膜を通じた Ca^{++} 流入のインディケータとして用いられる。

オ7に 繊毛の構造はヒトの気管支の繊毛など、高等生物のものと全く同一の“9+2構造”をとっており ATP をエネルギー源として運動している。そのため高等生物の繊毛運動のモデル系として用いることができる。

オ8に 生理的適応現象や老化現象が比較的短期間で起こり、そのメカニズムの解明に有利である。この様にゾウリムシは、多くの特質を兼ねており、

ゾウリムシを研究することにより、より広範な生命現象が解明できるものと期待される。

3-b ゾウリムシの膜興奮現象と行動

ゾウリムシにガラス管微小電極を刺入し、細胞内外の電位差を測定すると、ほぼ一定の値を示す。これは、静止電位(resting potential)と呼ばれ、通常の条件で $-20 \sim -30 \text{ mV}$ の値となる。この静止電位は、外液の陽イオン濃度を上昇させると浅くなる。この度合は、 K^+ イオンでもっとも大きく、 Ca^{++} 、 Na^+ イオンでは小さい。この事から細胞膜の透過性は K^+ イオンが一番高いと言える。(Naitoh & Eckert 1969) 一方陰イオンの透過性は低い。

普通ゾウリムシが棲息している環境では主な陽イオンは mM 程度の K^+ と Ca^{++} であり細胞内の K^+ 濃度は約 20 mM 、 Ca^{++} 濃度は $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ M}$ であって静止電位はFig 3に示す様に Ca^{++} と K^+ の平衡電位と関係づけられ、それは近似的にHodgkin & Horowiczの式

$$E_m = \frac{1}{G} \left(g_k \frac{RT}{F} \ln \frac{[\text{K}]_o}{[\text{K}]_i} + g_{\text{Ca}} \frac{RT}{2F} \ln \frac{[\text{Ca}]_o}{[\text{Ca}]_i} \right) \dots (1)$$

g_k ; K conductance g_{Ca} ; Ca conductance

$G = g_k + g_{\text{Ca}}$; total conductance

で表現できる。

ゾウリムシは繊毛運動により、水中を泳ぐが、溶液のイオン組成や温度の変化が刺激となり、泳ぎのパターン

が変化する。(Houten 1979, 1982, Hennessey et al. 1979)

この様な遊泳行動の変化は膜の興奮性と密接な関係にある。この関係は逃避行動の機構についてよく説明

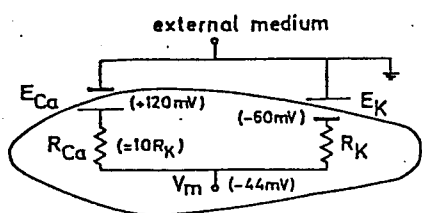


Fig 3 ゾウリムシの静止電位を説明する模式図

されており Fig 4 に示す考え方で説明されている。(Eckert & Brehm 1979, Eckert, Naitoh & Machemer 1976)

すなわち、壁にぶつかり頭部が機械的的刺激を受けると受容電位が発生して膜電位が脱分極する。

これにより繊毛内の電位依存性 Ca^{++} チャンネルが活性化され、

“Ca-spike” が発生する。この spike

にともない Ca^{++} が流入し、細胞内 Ca^{++} 濃度が上昇する。(Ogura &

Machemer 1980, Naitoh & Eckert 1968)

この Ca^{++} が繊毛内で作用し、

逆転打をひき起こす。やがて

Ca^{++} ホルモン7°により、 Ca^{++} 濃度が

定常値まで減少させられると、

繊毛打は、前向きに回復する。

この様な Ca^{++} の繊毛打逆転作用

は、Triton model によっても確か

められている。(Naitoh & Kaneko 1973)

ゾウリムシの適応現象について

は、イオン (Hildebrand 1976, 1978)

の場合と温度 (Toyotama & Nakaoka

1979, Nakaoka & Oosawa 1978) の場合

が報告されているが、そのメカニズムに

ついては未だ充分明らかにされていない。

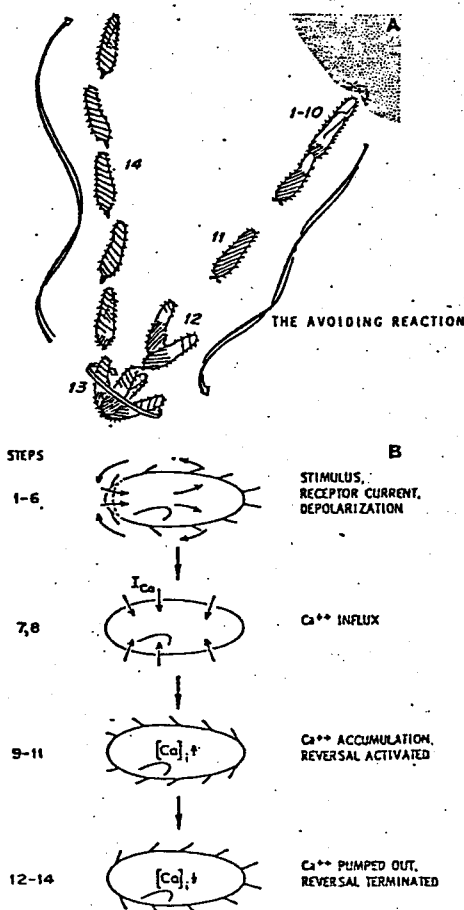


Fig 4 ゾウリムシの逃避行動のメカニズムを説明する模式図

第二章 材料及び方法

1) 材料

実験に用いたゾウリムシは *Paramecium caudatum* (mating type V, syngen 3) である。wild type としては Ksy-1 株と G-3 株 (これは天然の trycocyst-nondischarge mutant であるが普通 wild type として扱われている) を用い、突然変異株としては、遺伝的背景が G-3 株である cnr-A 株 (caudatum non-reverse 16A-326) と K-resistant (K115) 株を用いた。cnr-A 株は、興奮性 Ca^{++} チャンネルの変異株であり、後退避泳ができない。K-resistant 株は、wild type が生存できない高い K^{+} イオン環境下 (20 mM 以上) でも生存が可能である。

3mM Tris maleate buffer (pH; 7.0) を含む稀ワラを 20 分間オートクレーブにかけた後、バクテリア (*Aerobacter aerogenes*) を植えて 1 日後にゾウリムシを植えて培養した。培養温度は $25^{\circ}C$ に保った。定常期にあるゾウリムシを低速遠心によって集めるとともに、適応させるべき溶液 (通常 $0.25\text{ mM } CaCl_2$, $1\text{ mM } Tris \cdot HCl$ pH 7.2 及び $1/3$ の濃度の KCl) で洗い、その後約 3 時間その液に適応させて、実験に用いた。なお第三章の wild type の実験には主に Ksy-1 株を用い、第四章、第五章の実験には、G-3 株を用いた。

2) 行動解析の方法

Paramecium caudatum の行動解析のために、銅板上に、ガラス板を接着した容器 (深さ 2 mm, 縦 21 mm, 横 35 mm)

を用いた。(Fig 5) 銅板の下には、7-ルニックス (Komatsu-Yamato CRT-120) により 25°C

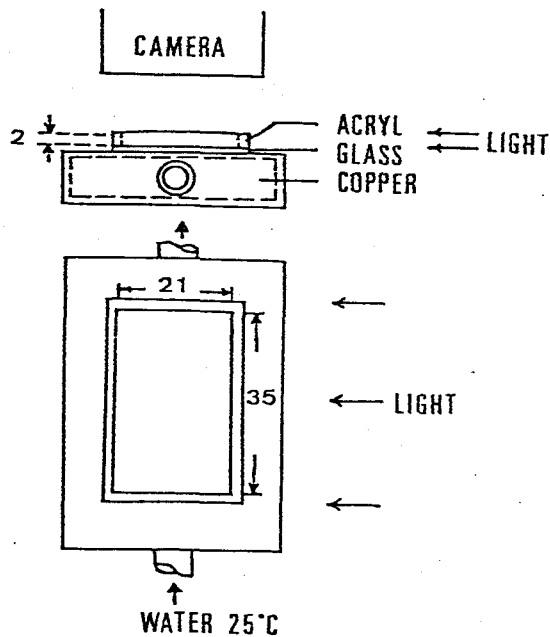


Fig 5 行動解析用容器の模式図
 容器の温度は循環水により 25°C に保たれている。照明は容器の横より行ない、真上から暗視野撮影を行なう。

に調節された水が流れる。

ゾウリムシの行動は容器上方より 35 mm カメラによる暗視野撮影により記録した。泳ぎの速さは 2 秒間露出の軌跡写真で 50 個以上のゾウリムシの軌跡の長さを平均して求めた。

『K 刺激』による後退遊泳の時間は実体顕微鏡下でホール・スライド中に入れた K 刺激溶液 (KCl 32 mM, CaCl₂ 0.25 mM, Tris-HCl pH 7.2 1 mM) に約 30 個の細胞を含む液を急速に混合した後、約半数が後退をやめるときの時間を求めた。これを数回くり返し、その平均値

を求めた。又、細胞一個を微小ピペットで 30 μl の充分量の K 刺激溶液に入れ、後退時間を測定し、数匹の平均値を求める方法でも行なった。時間経過を決定する実験は、主に後者によって行なった。

4) 電気生理学的実験の方法

膜電位の記録は、ガラス管微小電極を細胞内刺入することにより行なった。基本的には Naitoh & Eckert (1972)

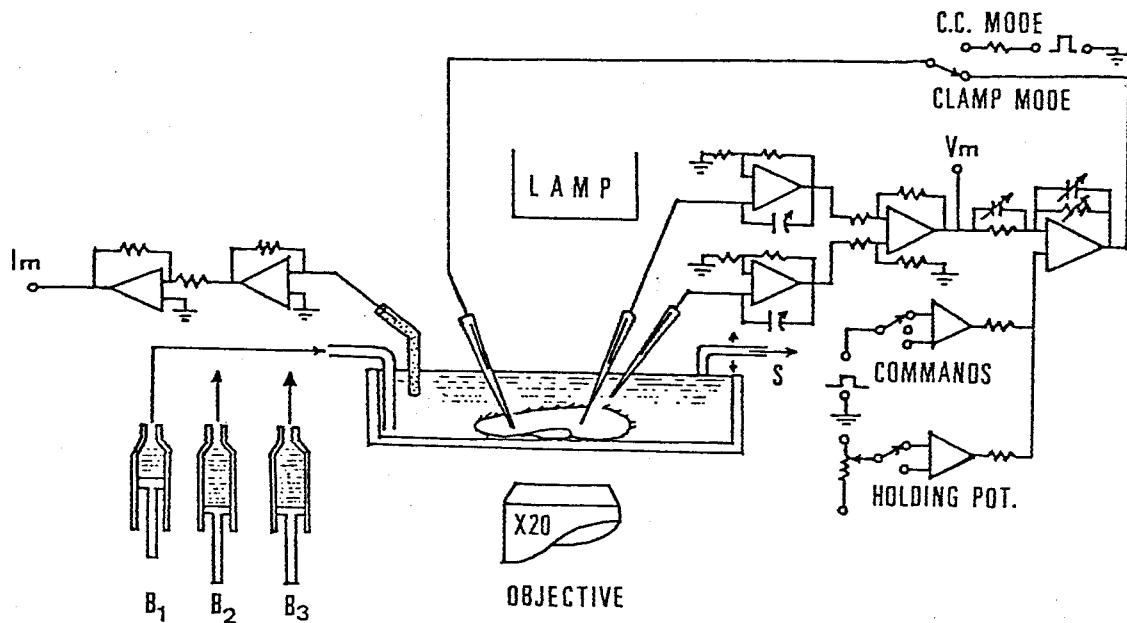


Fig 6 電気生理学的実験装置の構成

細胞内電流刺激用電極と細胞内電位記録用電極は細胞の長軸上に刺入し、細胞外電位対照用電極は、細胞のすぐそばの外液中に固定した。

C.C.Mode ; 定電流刺激 mode

Clamp mode ; 膜電位固定 mode S ; 吸引チューブ

V_m ; 膜電位, I_m ; 膜電流, $B_1 \sim B_2$; 異なるイオン組成の試験溶液

の方法と同様である。ただし彼らの方法 (hanging drop method) と異なり、倒立顕微鏡を用いてゾウリムシを含む水滴の上方より、ガラス管微小電極をおろし、刺入する方法をとった。この方法では、内藤らの方法より、微小電極の作製、材料への刺入が容易である。

電流刺激用ガラス管微小電極と細胞内電位記録用ガラス管微小電極の中は、1M KCl で満した。これと同様のガラス管微小電極を、細胞表面近くにおき、細胞外電位対照とした。膜電位は、細胞内電極と細胞外対照電極の間の電位差として測定した。それぞれの電極抵抗は30から40M Ω である。

膜電位固定法の回路は他の材料で用いられているものを参考に作製した。(Meech & Standen 1975, Kishimoto 1972, Machemer & Eckert 1975)

Teledyne Philbrick 1023と1026 で構成された instrumentation Amp の出力と、矩形波の command pulse 電位、膜電位固定レベルから高出力差動 feedback Amp (Teledyne Philbrick 1022) により『比較』("compare") されることにより電位固定が行われる。膜電位固定回路の開環利得(open loop gain) は、3000 から 4000 である。電流の測定は、Teledyne Philbrick 1035-02 operational Amplifier を用い、3M KCl を含む寒天ブリッジを通した Ag-AgCl 電極を用いて行なった。この様な条件下でステップ電位を command に入力すると、電位は 1 msec 以内で一定値に達した。実験は、24 ~ 25 °C において行なった。

5) 細胞内イオン濃度の測定

細胞内の K^+ イオン濃度は、Atomic Absorption & Flame Emission Spectrometer (Nippon-Jarrel Ash AA-845) を用いて測定した。

適応溶液に細胞を約 3 時間適応させた後、cheese-cloth でのろ過し、低速遠心で 3 分間遠心した。集められた細胞は洗浄液 ($CaCl_2$: 0.25 mM, Tris·HCl pH 7.2 1 mM) で 3 回洗浄し、1 cc の cell suspension とした。写真撮影により細胞数を計測した後、熱湯抽出を 5 ~ 10 分行ない、遠心し、その上清について原子吸光装置により、細胞内イオン濃度を測定した。ただし、細胞の体積は 5.6×10^{-7} ml (Fortner 1925)

とした。なお後述の様に、 K^+ 電流によって、細胞内 K^+ 濃度を推定することも試みた。

6) 電気泳動的細胞微小注射 (ionophoretic microinjection)

注入には、通常のかラス管微小電極に、K-EGTA (ethylene-glycol-bis-aminoethylether N,N-tetraacetic acid) 100 mM, Pipes buffer (pH7.0) 10 mM を入れたものを用いた。実験手順は、まず細胞を静止電位に膜電位固定し、次に微小注射用ガラス管微小電極を刺入し、静止電位に膜電位固定した状態で $10nA$, 1分間通電を行った。細胞中にEGTAが入った事は、電流刺激による Ca 活動電位のpeakが高くなる事、Double pulse methodによる Ca チャネルの不活性化が弱くなること等により、確かめた。この条件下では、EGTAは約 $10^{-4}M$ 注入されている。

第三章 ゴウリムシのイオン環境に対する恒膜電位適応

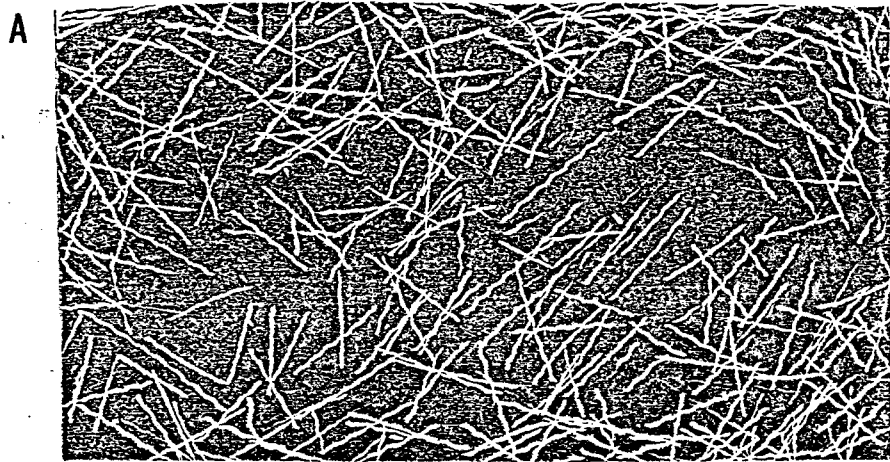
§1 緒言

ゴウリムシは、イオン組成の異なる溶液の中で様々な行動パターンをとることが知られている。(Jennings 1906) この行動パターンの中で遊泳速度をパラメータにとり、イオン環境への適応現象を観察することができる。この現象を行動学的に、又、電気生理学的に調べイオン環境適応のメカニズムを明らかにする目的で実験を行った。

§2. 実験結果

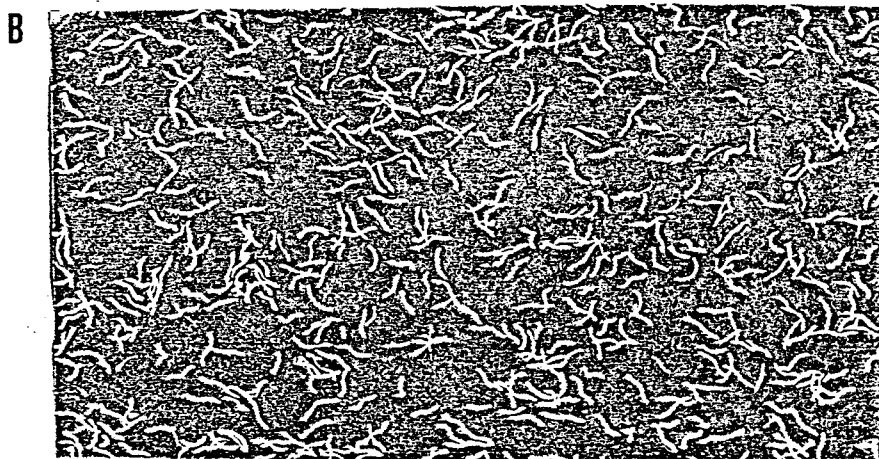
2-a 行動学的環境適応

ゴウリムシを KCl , $CaCl_2$ と $Tris \cdot HCl$ (pH 7.2 1mM) を成分とする溶液中で遊泳をさせる。Fig 7 に示される様に KCl 濃度が低い、又は $CaCl_2$ 濃度が高い溶液に移されると遊泳速度が増大する。その反対に、 KCl 濃度が高いか $CaCl_2$ 濃度が低い溶液に移されると、遊泳速度が減少する。この様な速度の増減は、 K^+ と Ca^{++} の相対的な濃度関係により、変化する。たとえば Ca^{++} 0.25 mM, K^+ 5 mM の溶液に適応させた細胞を用いて試験溶液の K^+ 濃度を変えて遊泳速度を測定すると、 K^+ 濃度が低いと遊泳は加速状態になるが K^+ 濃度が高いと遊泳速度が減少する。(Fig 8) 試験溶液の Ca^{++} 濃度を増大させると高い K^+ 濃度でも加速の状態が



5 mm

$$\frac{[K^+]}{\sqrt{[Ca^{2+}]}} : \text{Low}$$



$$\frac{[K^+]}{\sqrt{[Ca^{2+}]}} : \text{High}$$

Fig 7 試験溶液中でのゾウリムシの軌跡写真

露出時間；2秒

Aは $[K^+]$ が小さいか $[Ca^{2+}]$ が大きく加速している場合

Bは $[K^+]$ が大きく、 $[Ca^{2+}]$ が小さく通常の遊泳速度の場合。

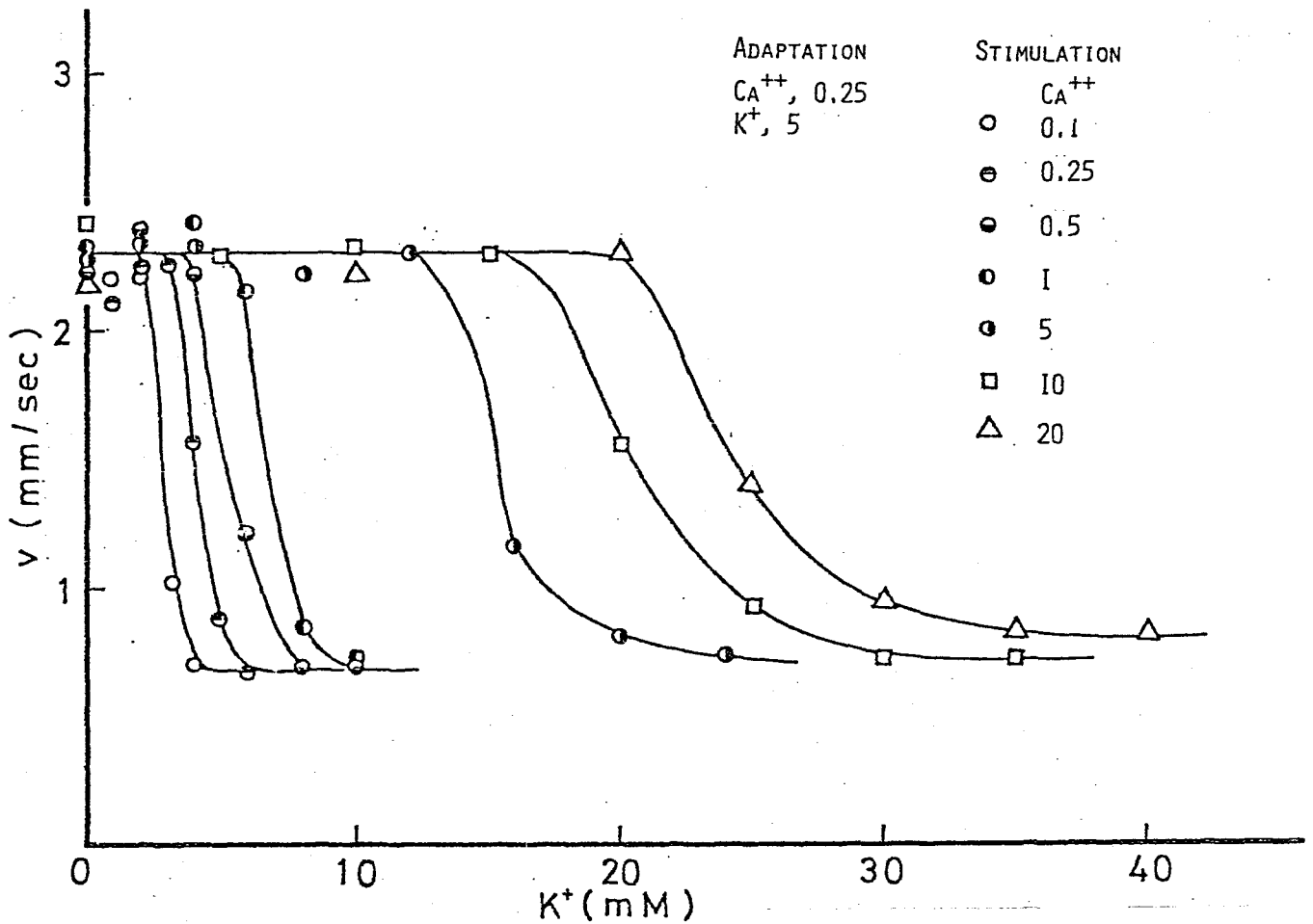


Fig 8 細胞の遊泳速度に対する Ca^{++} 濃度の影響

$CaCl_2$ 0.25 mM, KCl 5 mM に適応した細胞を用い、試験溶液の K^+ 濃度, Ca^{++} 濃度を変えた時の遊泳速度を示す。横軸は、試験溶液の K^+ 濃度, その時の Ca^{++} 濃度は記号で示す。
 (単位は mM)

保たれる。試験溶液の K^+ 濃度を一定にした場合、その Ca^{++} 濃度が增大すると加速し、 Ca^{++} 濃度が減少すると速度は減少する。このような関係は $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ という変数 (Jahn T.L. 1961, 1962, Naitoh 1968) をとりグラフを書き直すとほぼ 1 つの曲線上にのって来る。すなわち、 $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ の値が適応した値より低いと加速が起こり、 $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ が高いと低い遊泳速度を保つという関係がある。

この様な遊泳速度の増減は細胞がはじめどの様な K^+ と Ca^{++} の濃度の液に適応していたかという事に影響される。これらの関係を調べると Fig 9 に示される様な結果が得られた。即ち適応溶液と試験溶液の Ca^{++} 濃度を 0.25mM と一定にしておき、 K^+ 濃度のみを変化させると、遊泳速度は適応している K^+ 濃度

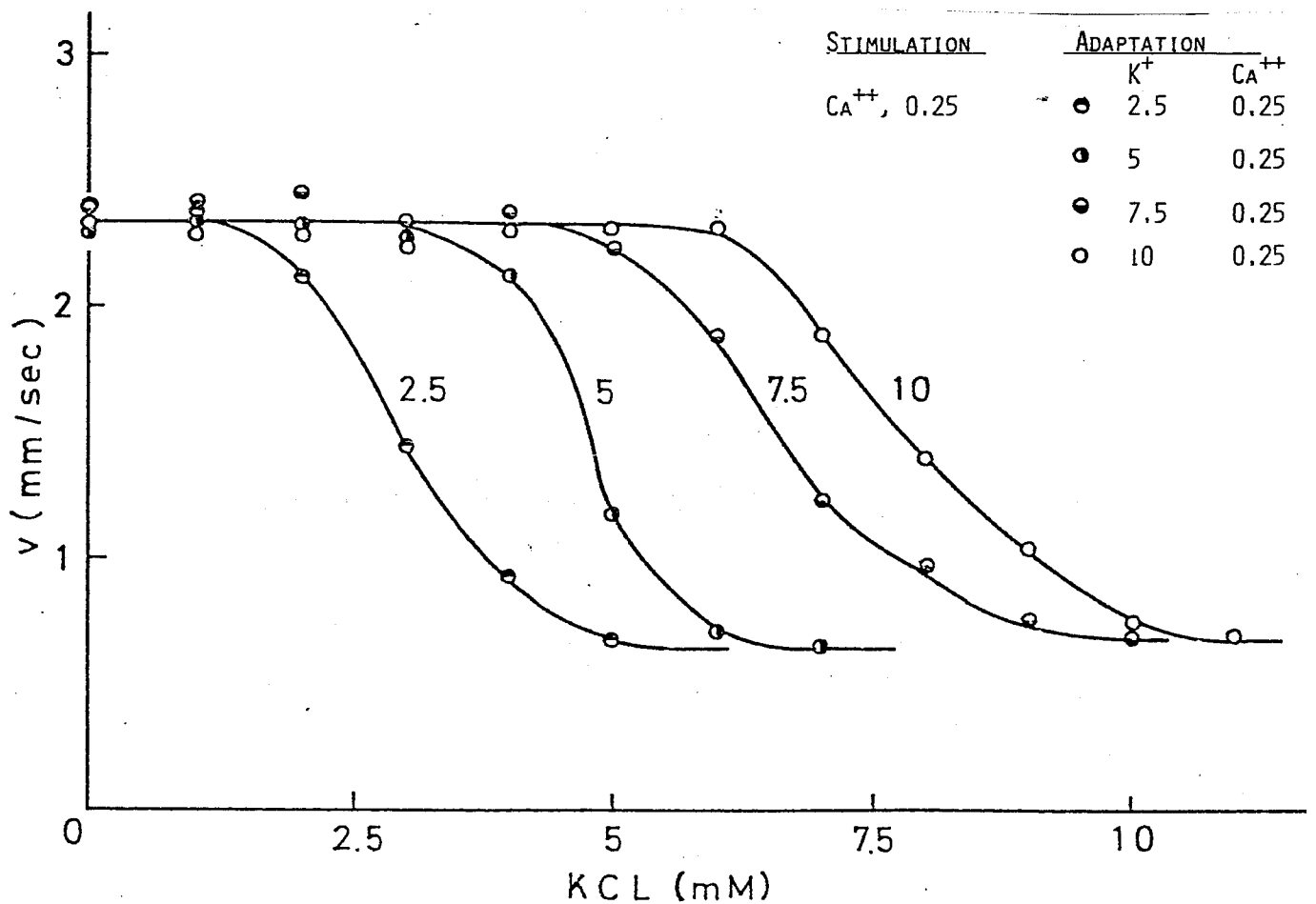


Fig 9 様々な K^+ 濃度の溶液に適応させた細胞の遊泳速度
 曲線の横に示した数値は適応 K^+ 濃度 (mM), 横軸は、
 試験溶液の K^+ 濃度を示す。 Ca^{++} 濃度はすべて 0.25mM とした。

を境にして、これより K^+ 濃度が減少すると加速が起こり、さらに濃度を減少させても一定の加速した遊泳速度を保つ。逆に K^+ 濃度を適応した濃度よりも増大させると遊泳速度はやや減少するか一定の値を示す。さらに濃度を上昇させてもその値は、ほぼ一定に保持される。この結果様々な K^+ 濃度に適応させた細胞の遊泳速度の K^+ 濃度依存性曲線は、適応した K^+ 濃度に応じて平行移動することがわかる。

適応したイオン環境により試験溶液中での遊泳速度が異なる事を利用し、新しいイオン環境への再適応

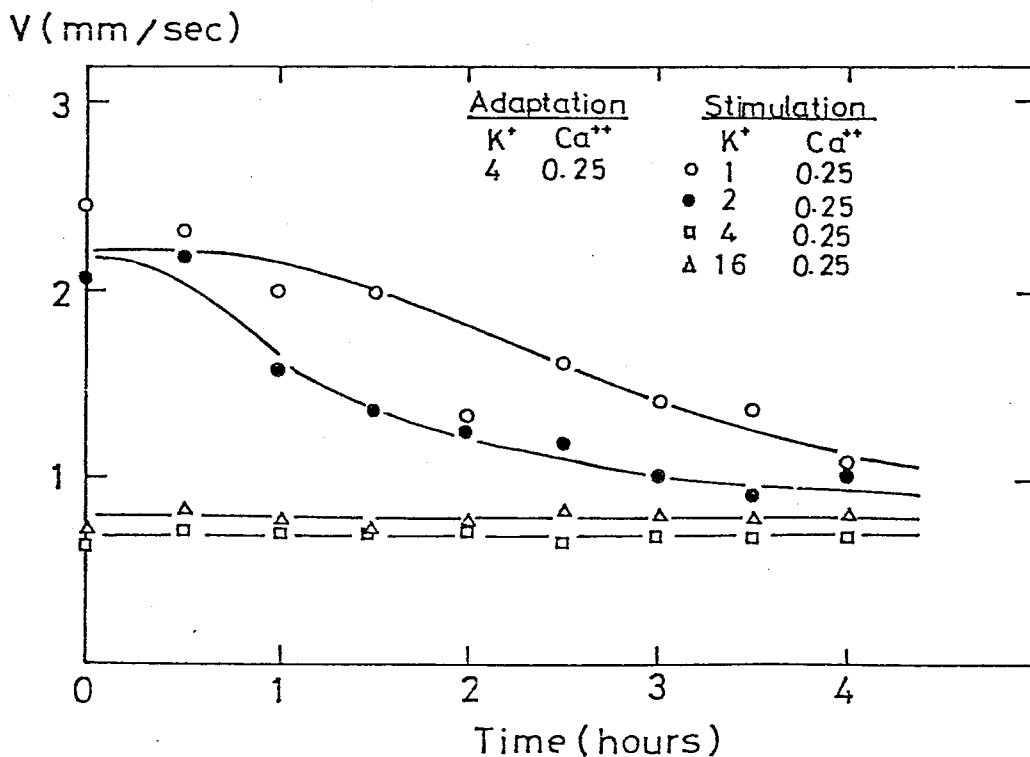


Fig 10 再適応の時間経過

Ca^{++} 0.25 mM, K^+ 4 mM に適応した細胞を様々な K^+ 濃度の溶液に再適応させた。横軸は、新しい適応液に移してから時間、縦軸は、それぞれの新しい適応溶液中での遊泳速度を示す。

の過程を調べることができ、 K^+ 4 mM, Ca^{++} 0.25 mM に適応した細胞を様々な K^+ 濃度の溶液に再適応させた時の時間経過を示したのが Fig 10 である。適応した値よりも低い K^+ 濃度の溶液に移された細胞は、初めは加速しているが数時間後、定常の遊泳速度にもどる。この再適応に要する時間は、 K^+ の濃度差が大きければ長くなる。一方 K^+ 濃度を高くした時の再適応の過程は、遊泳速度が変化しないため、この方法では観察されない。

2-b, K^+ 濃度変化に対する適応に伴う膜電位変化

次に異なる K^+ 濃度に適応した事による行動上の変化の原因をさぐるために電気生理学的実験を行った。イオン環境適応に伴い、膜電位がどのように変化するか、一匹のゾウリムシでは、約1時間追跡することは可能であるが、再適応が終了するまで測定するのは困難である。そこで、異なる K^+ 濃度に適応した細胞の静止電位が、外液の K^+ 濃度に対しどのような依存性を持つか、いくつかのゾウリムシについての平均値を調べた (Fig 11)。膜電位は外液の K^+ 濃度が上昇すると脱分極するが、適応した K^+ 濃度が低い場合、この関係は全体として脱分極方向に平行移動する。その結果それぞれが適応している K^+ 濃度の溶液中では膜電位は $-15 \sim -20$ mV の範囲でほぼ一定の値を持つ。すなわち、ゾウリムシは膜電位が一定となるように変化し、適応していることになる。

次に、これから様々な K^+ 濃度の溶液に適応した細胞について

その膜電位の外液の Ca^{++} 濃度依存性を調べた (Fig 12) 膜電位は、外液の Ca^{++} 濃度が増大すると脱分極するが、この関係は適応した K^+ 濃度が低い程全体として脱分極側に平行移動する。

この様な膜電位の 外液 K^+ 濃度に対する依存性 (Fig 11) と 外液 Ca^{++} 濃度に対する依存性 (Fig 12) の傾きを適応させた K^+ 濃度に対してプロットしたのが Fig 13 である。これより適応 K^+ 濃度が低い程、

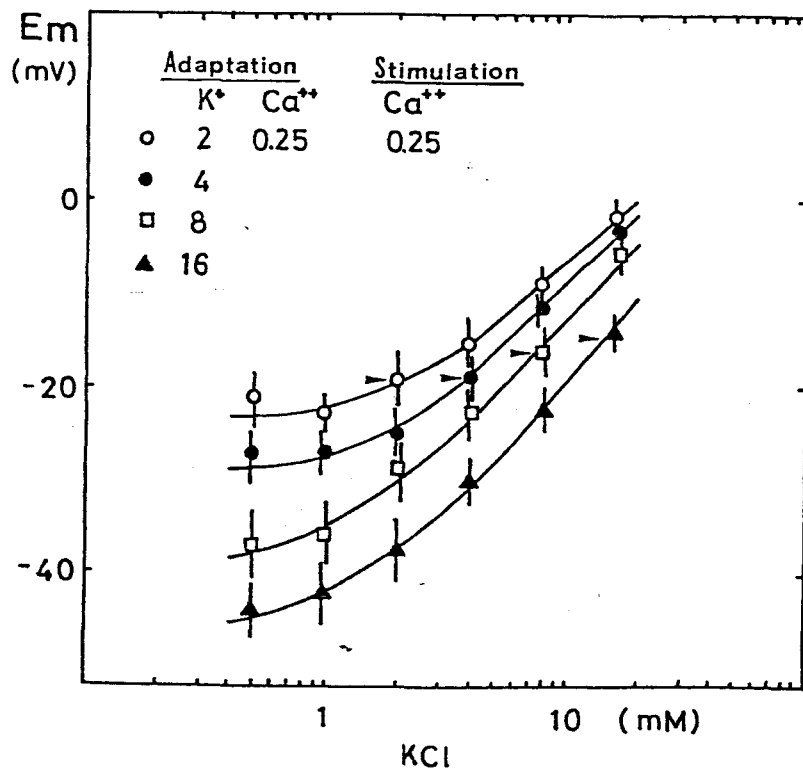


Fig 11 様々な K^+ 濃度の溶液に適応した細胞の膜電位の $[K^+]$ 依存性
記号に示す K^+ 濃度に適応した細胞を用い、試験溶液の K^+ 濃度 (横軸) を変えた時の静止電位。矢印は、適応溶液中での静止電位を示す。

Table I. 適応による膜抵抗の変化

Solu. \ Adapt.	$[K^+] = 2\text{mM}$	$[K^+] = 8\text{mM}$
$[K^+] = 2\text{mM}$	$58.2 \pm 16.2 \text{ M}\Omega^*$	$35.2 \pm 9.9 \text{ M}\Omega$
$[K^+] = 8\text{mM}$	$31.5 \pm 15.8 \text{ M}\Omega$	$21.0 \pm 4.8 \text{ M}\Omega$

* 膜抵抗は $0.1 \mu\text{A}$, 200msec の矩形波電流刺激に対する膜電位変化より求めた。

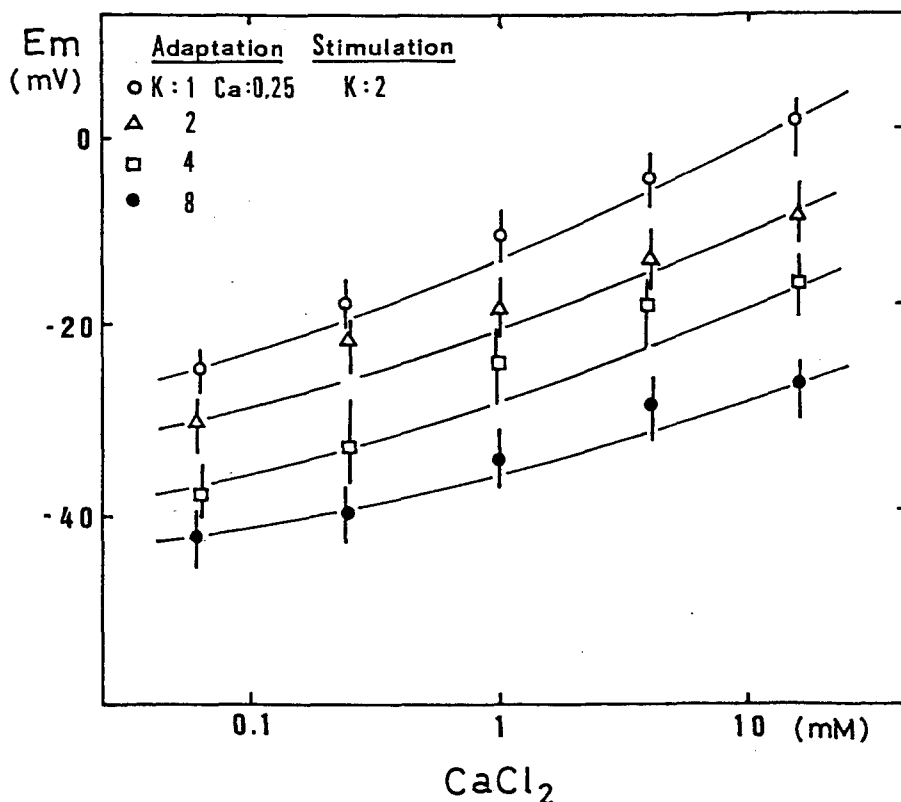


Fig 12 様々な K^+ 濃度の溶液に適応した細胞の膜電位の $[Ca^{++}]_o$ 依存性
 記号に示す K^+ 濃度 (mM), 0.25 mM Ca^{++} 濃度の溶液に適応した細胞を用いて試験溶液の Ca^{++} 濃度 (横軸) を変化させた (K^+ 濃度はすべて 2 mM) 時の静止電位の変化。

Table II. 膜電位に対する細胞外Ca⁺⁺濃度,及びK⁺濃度の影響

Adapt Test	Hay Infusion +10mM CaCl ₂	Control Hay Infusion	Hay Infusion +10mM KCl
Control ([Ca ⁺⁺] _o : 0.25, [K ⁺] _o : 5)	-31.4±0.9mV*	-27.9±4.0mV	-34.8±1.9mV
High K ⁺ ([Ca ⁺⁺] _o : 0.25, [K ⁺] _o : 10)	-	-23.8±4.4mV	-27.7±1.2mV
High Ca ⁺⁺ ([Ca ⁺⁺] _o : 10, [K ⁺] _o : 5)	-25.6±2.5mV	-24.0±4.0mV	-

* 7及び8サ=70ルの平均膜電位とその標準偏差

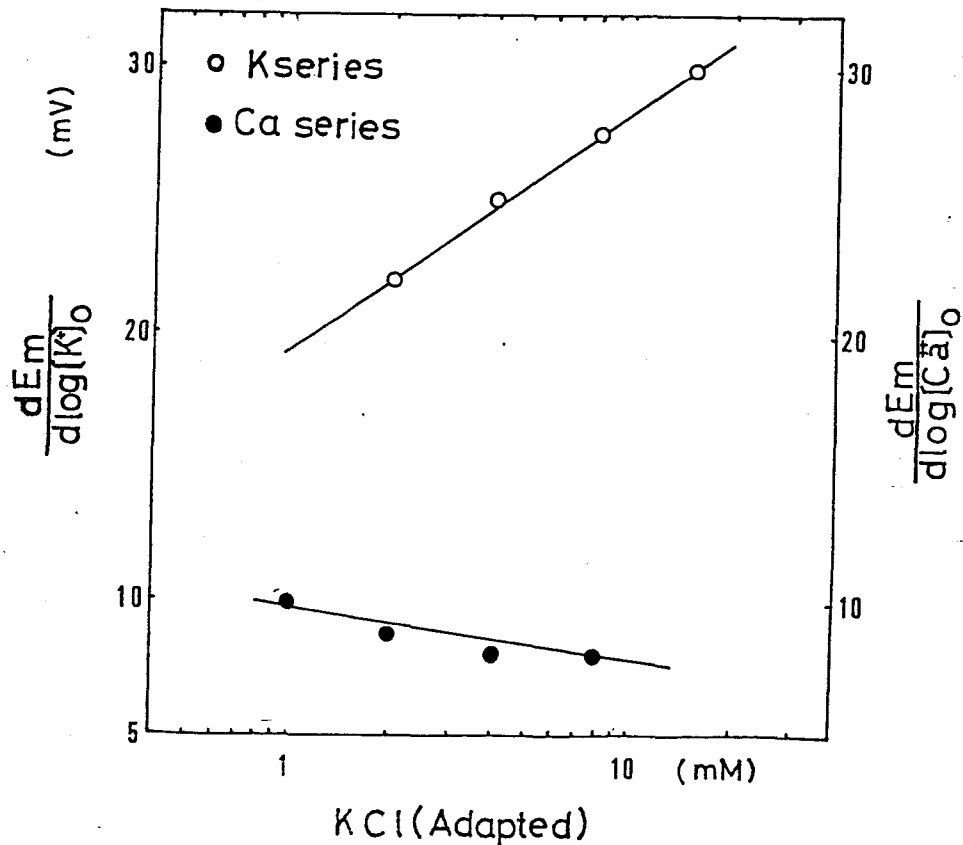


Fig 13 膜電位の [K⁺]_o 依存性曲線 (Fig 11) の傾きと [Ca⁺⁺]_o 依存性曲線 (Fig 12) の傾きの適応 K⁺ 濃度に対する変化。横軸は適応させた K⁺ 濃度, 縦軸は Fig 11, 12 の傾き (K⁺ 濃度あるいは Ca⁺⁺ 濃度を 10 倍変化させた時の膜電位変化) を示す。

膜電位の K^+ 濃度依存性は大きくなるが、 Ca^{++} 濃度依存性は少く減少の傾向とすることがわかる。

又、適応に伴う input resistance の変化を測定した (Table I) その結果 $K^+ = 2 \text{ mM}$ の溶液に適応した細胞は、 $K^+ = 8 \text{ mM}$ の溶液に適応した細胞と比較し、 $K^+ = 2 \text{ mM}$ の測定溶液中で約 1.7 倍、 $K^+ = 8 \text{ mM}$ の測定溶液中で約 1.5 ~ 1.7 倍の input resistance を持つことがわかる。すなわち、 $K^+ = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞は、 $K^+ = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞と比較し、1.5 ~ 1.7 倍 conductance が上昇している。

適応したイオン条件で膜電位が一定になるという傾向は、外液の Ca^{++} 濃度を変えて適応させた場合にもみられる。Table II に示すように培養液に Ca^{++} を加えた溶液に適応させた細胞は加えないもの compared 膜電位が過分極方向に移動している。これはソーリウムシが、外液に Ca^{++} を加えられた事による膜電位の脱分極分を補正し、膜電位を適応した環境中で一定に保つ向きに変化させたことを示している。

2-C 環境適応に伴う $[K^+]_i$ の変化

2-C-1 原子吸光法による測定

K^+ 濃度の異なる溶液に適応した時細胞内 K^+ 濃度がどのように変化するか原子吸光法で調べた。 $K^+ = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞と $K^+ = 8 \text{ mM}$ の溶液 (他の成分は、 $CaCl_2$ 0.25 mM , $\text{Tris} \cdot \text{HCl}$ $\text{pH} 7.2$ 1 mM) に適応した細胞について測定を行なった結果 (Table III) $K^+ = 2 \text{ mM}$, 8 mM の溶液に適応した細胞は、細胞内 K^+ 濃度がそれぞれ

20.8 ± 2.5 mM, 22.6 ± 1.6 mM であることがわかった。
 わずかではあるが $K^+ = 8 \text{ mM}$ の溶液に適応した細胞
 の方が細胞内 K^+ 濃度が高くなる傾向がある。

2-c-2 Tail current による測定

ゾウリムシの膜の性質を膜電位固定法を用いて示した
 のが Fig 14 である。電圧 pulse が小さい時には後動的
 膜電流が脱分極に対しても過分極に対してもみられる。
 脱分極の電圧 pulse を徐々に大きくしていくと一過性
 の Ca^{++} の内向電流が流れ、ひき続き外向きの K^+ 電流が
 流れる様になる。この K^+ 電流には電位依存性の K^+
 電流と Ca^{++} 依存性の K^+ 電流が存在することが知られて
 いる。(Oertel D. et al. 1977, Satow Y. & Kung C. 1980,
 Brehm P. et al. 1978, 1980) 一方過分極の電圧 pulse を
 徐々に大きくすると内向電流が急激に増大する様な
 異常整流 (Anormalous rectification) と呼ばれる現象が

Table III. 細胞内 K^+ 濃度の適応による変化

Method	Adapt.*	[K^+] = 2mM	[K^+] = 8mM
	Atomic Absorp.		20.8 ± 2.5mM
Tail Current		20.8mM	25.1mM

* 適応 K^+ 濃度

($CaCl_2$; 0.25mM, Tris.HCl pH7.2 1mM)

みられる。この過分極性電圧 pulse をかけた後、急激に元の静止電位に再固定すると外向きの Tail current が観察される。この Tail current は過分極により活性化された K^+ チャネルが閉じる過程に対応していると考えられる。(Oertel et al. 1978) この事を確認するために今、過分極 pulse 1 pulse の直後の pulse 2 pulse の電位 E での Tail current を I_{tail} とすると

$$I_{tail} = g_A (E - E_A) \quad \text{----- (2)}$$

E_A ; 異常整流を担うイオンの平衡電位

g_A ; 異常整流のチャネルの conductance

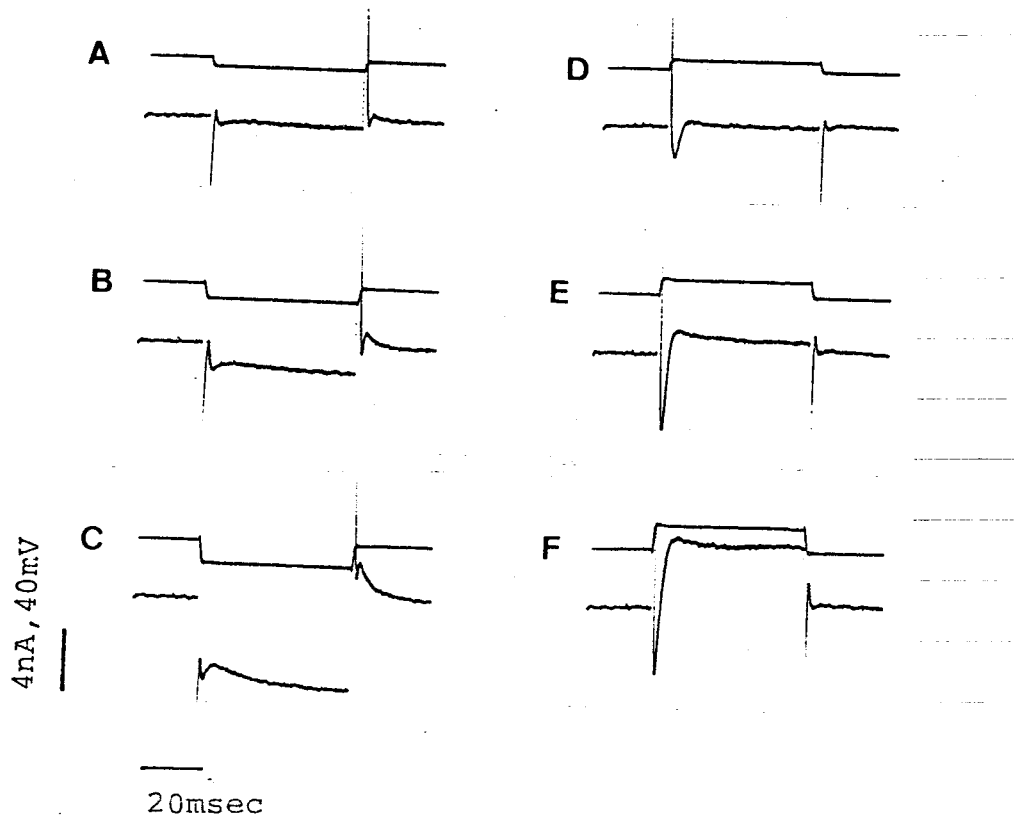


Fig 14 膜電位固定下での電流電圧応答

[K^+] = 2 mM に適応した細胞をその溶液中で測定

1 pulse の持続時間は 50 msec A, B, C; 過分極応答

D, E, F; 脱分極応答

と書ける。E を変えて $I_{tail} = 0$ となる Reversal potential $E_{Rev.}$ は、

$$E_{Rev} = E_A \quad (3)$$

となる。この E_A は Nernst の式に従い

$$E_{Rev} = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[A]_o}{[A]_i} \quad (4)$$

z ; 異常整流を担うイオンの価数

R ; 気体定数 F ; Faraday constant

[A]_i ; 異常整流を担うイオンの細胞内濃度

[A]_o ; 異常整流を担うイオンの細胞外濃度

と表わせる。この関係から実験より E_{Rev} の値を得ると、 $[A]_i$ を決定することができ、そこでこの方法を用い、適応した K^+ 濃度の異なるゾウリムシについて細胞内 K^+ 濃度を測定した。

まず Fig 15 では、一定の大きさの過分極 pulse の持続時間を変えた場合の異常整流の電流の大きさと Tail current の大きさの関係をみた (Fig 15)。過分極性電圧 pulse の持続時間を長くするとともに、この異常整流の電流の大きさとほぼ比例して Tail current も大きくなる。すなわちこの Tail current の初期値の大きさは、異常整流を担うチャンネルが活性化していく過程をみていると考えることができる。この条件でチャンネルが活性化されるに要する時間は約 60 msec である。

Fig 2 pulse E の大きさを変えて Tail current (I_{tail}) が 0 になる Reversal potential ($E_{Rev.}$) を試験溶液の K^+ 濃度をいろいろに変化させて測定し、両者の関係をみると、Fig 16 の様になる。この結果は、 K^+ 濃度が 10 倍変化する

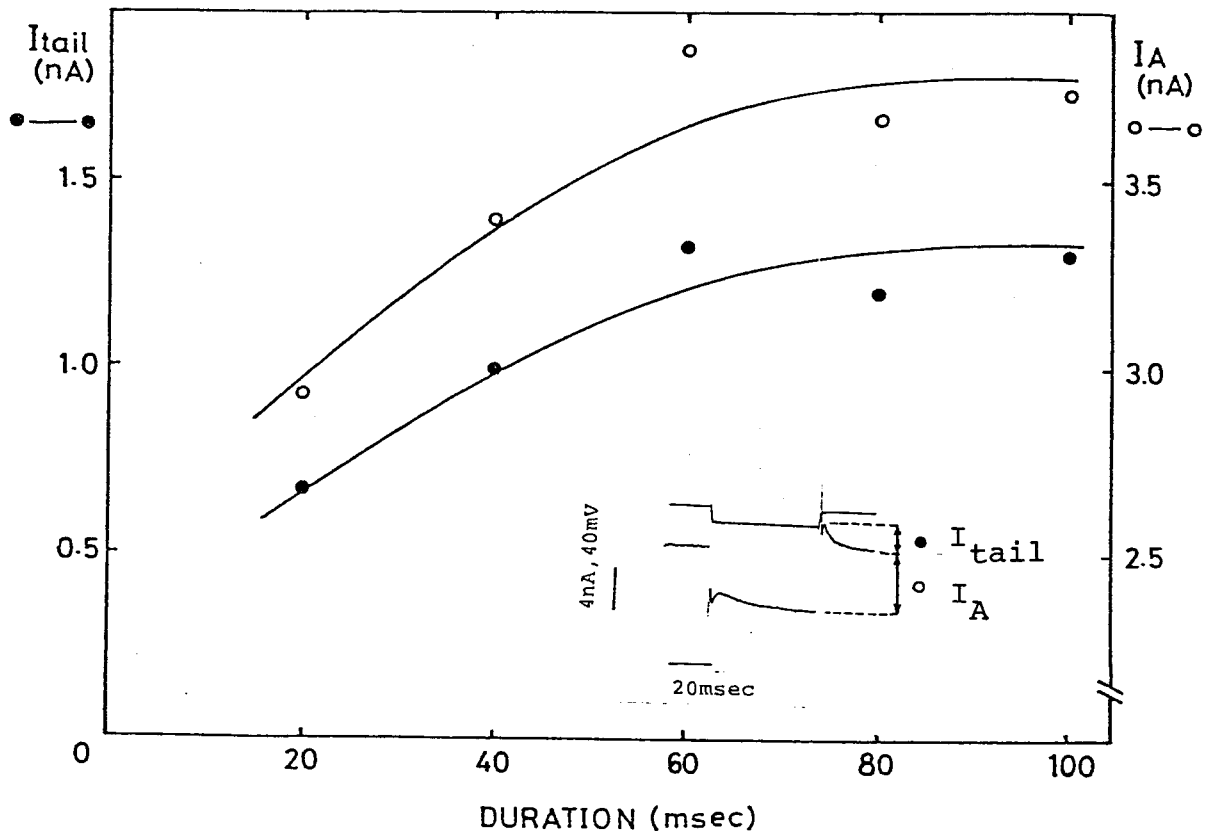


Fig. 15 異常整流に伴う内向電流とその Tail current の過分極オI pulse の持続時間に対する依存性

● I_{tail} ; Tail current の大きさ ○ I_A ; 異常整流に伴う内向電流の大きさ

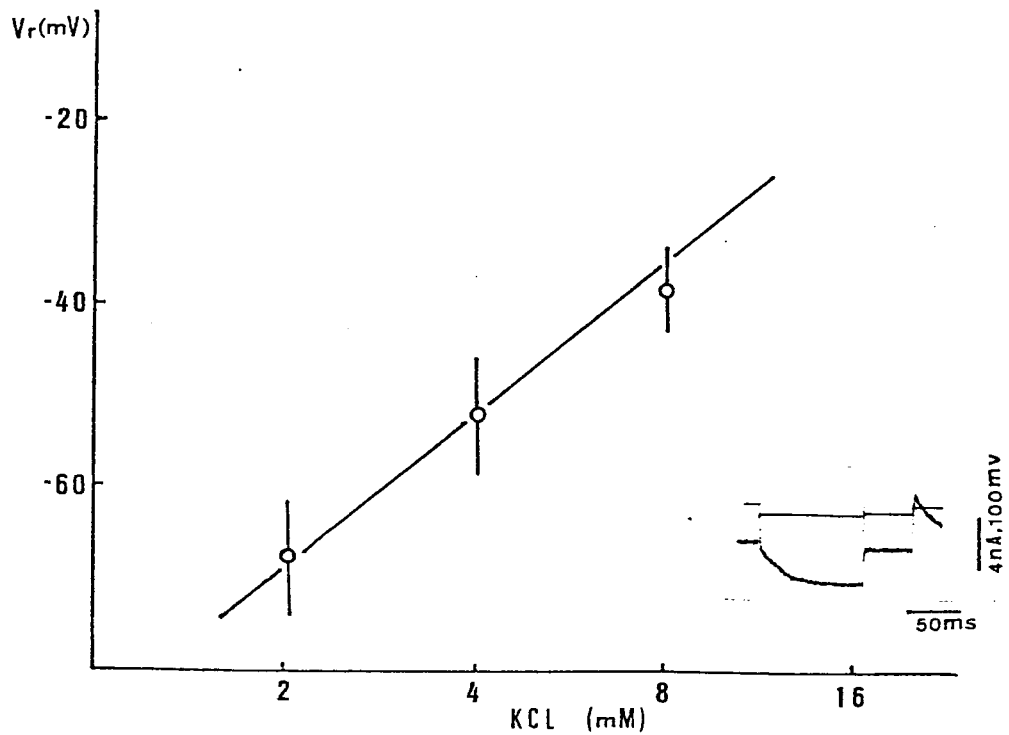


Fig 16 Tail current の Reversal potential の $[K^+]$ 依存性
直線は Nernst 電位の傾き ($58\text{ mV}/10$ 倍の $[K^+]$ 変化) を示す. 用いた細胞は $[K^+] = 8\text{ mM}$ に適応している.
波形は, Reversal potential での $I_{tail} = 0$ を示す.

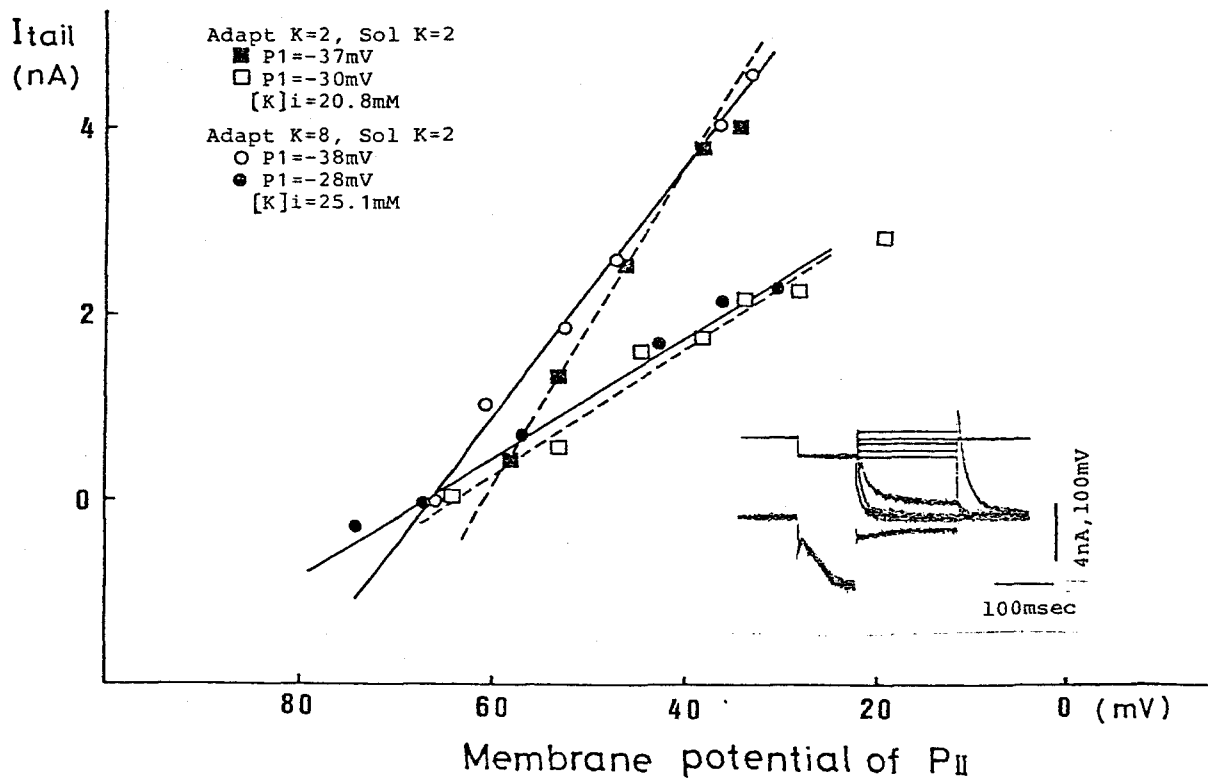


Fig 17 Tail current の Instantaneous I-V 曲線

Double pulse の 1 pulse 電位は固定し、2 pulse 電位の値を変え、その時の tail current の 2 pulse 電位依存性の直線の交点から Reversal potential を求めた。

この値を Nernst eq. に代入し、 $[K^+]_i$ を算出した。

$[K^+]_{adapt} = 2mM$, $[K^+]_o = 2mM$ の場合 $[K^+]_i = 20.8mM$

$[K^+]_{adapt} = 8mM$, $[K^+]_o = 2mM$ の場合 $[K^+]_i = 25.1mM$

K^+ 以外の溶液成分は、 $CaCl_2$ 0.25mM, Tris·HCl pH7.2 1mM
これはすべての液に共通

$[K^+]_{adapt}$; 適応 K^+ 濃度 $[K^+]_o$; 測定 K^+ 濃度

$[K^+]_i$; 細胞内 K^+ 濃度

Reversal potential が約 58 mV 変化していることを示しており、Nernst の式から予想される値と一致する。したがってここで測定したゾウリムシ細胞膜の異常整流の Tail current は、そのほとんどが K^+ 電流であるとみなしてよい。

これを利用して細胞内 K^+ 濃度を測定した。Fig 17 は、 $\text{K}^+ = 2\text{ mM}$ の溶液に適応した細胞と $\text{K}^+ = 8\text{ mM}$ の溶液に適応した細胞について測定した結果を示す。才 1 pulse の電位の絶対値を変化させ、開く K^+ チャンネル数を変え、それぞれの場台について Tail current の才 2 pulse 電位に対する依存性を測定した。この時 tail current = 0 の才 2 pulse 電位から reversal potential を求めると $[\text{K}^+] = 8\text{ mM}$ の溶液に適応した細胞の場合、才 1 pulse = -38.0 mV の時 -66.0 mV 、才 1 pulse = -28.0 mV の時 -67.0 mV となる。この reversal potential の平均値 -66.5 mV から (4) 式を用いて細胞内 K^+ 濃度は 25.2 mM と計算される。又、才 1 pulse 電位の異なる 2 つの Tail current の才 2 pulse 電位依存性の直線の交点から Reversal potential を、他のイオン電流は一定と仮定して求めると、 -64.0 mV となり、この方法からは、細胞内 K^+ 濃度は 25.1 mM と計算される。

次に、 $[\text{K}^+] = 2\text{ mM}$ の溶液に適応した細胞の場合、Tail current = 0 の時の才 2 pulse 電位から Reversal potential を求めると、才 1 pulse = -37.0 mV の時、 -60.5 mV 、才 1 pulse = -30.0 mV の時 -63.0 mV となる。この reversal potential の平均値 -61.8 mV から細胞内 K^+ 濃度は 23.3 mM と計算される。又、才 1 pulse 電位の異なる Tail current の才 2 pulse 電位依存性の 2 つの直線の交点から Reversal potential を求めると、 -64.0 mV となり、この方法からは細胞内 K^+ 濃度は、

25.1 mM と計算される。

これらの値は、原子吸光法によって得られた値とほぼ一致している。(Table III)

§ 3. 考察

ここでのベタ実験結果はゾウリムシがイオン濃度の異なる液に拘さぬと、その静止電位が変化しても、新しい液に適応するにともない電位が一定の値を保つ向きに変化することを示している。異なる K^+ 濃度に適応したゾウリムシでは、膜電位の外液 K^+ および Ca^{2+} 濃度依存性が変化していることがわかった。

そこでこれらの適応にともなう変化が膜のイオン透過性のどのような変化によるのかを知るために Goldman の膜電位表式を用いて、実験結果の解析を試みる。

ゾウリムシの場合、培養液や池の水の主な陽イオンは K^+ と Ca^{2+} であり、静止電位を決定しているのは K^+ 濃度と Ca^{2+} 濃度と考えられる。(Naitoh & Eckert 1972)

そこで K^+ と Ca^{2+} が共存する場合の Goldman の式は次の様に表わせる。

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_k [K^+]_o - P_k [K^+]_i + \sqrt{A}}{2P_k [K^+]_i + 8P_{ca} [Ca^{2+}]_i} \quad \text{---- (5)}$$

$$A = (P_k [K^+]_i - P_k [K^+]_o)^2 + 4(P_k [K^+]_o + 4P_{ca} [Ca^{2+}]_o) \times (P_k [K^+]_i + 4P_{ca} [Ca^{2+}]_i)$$

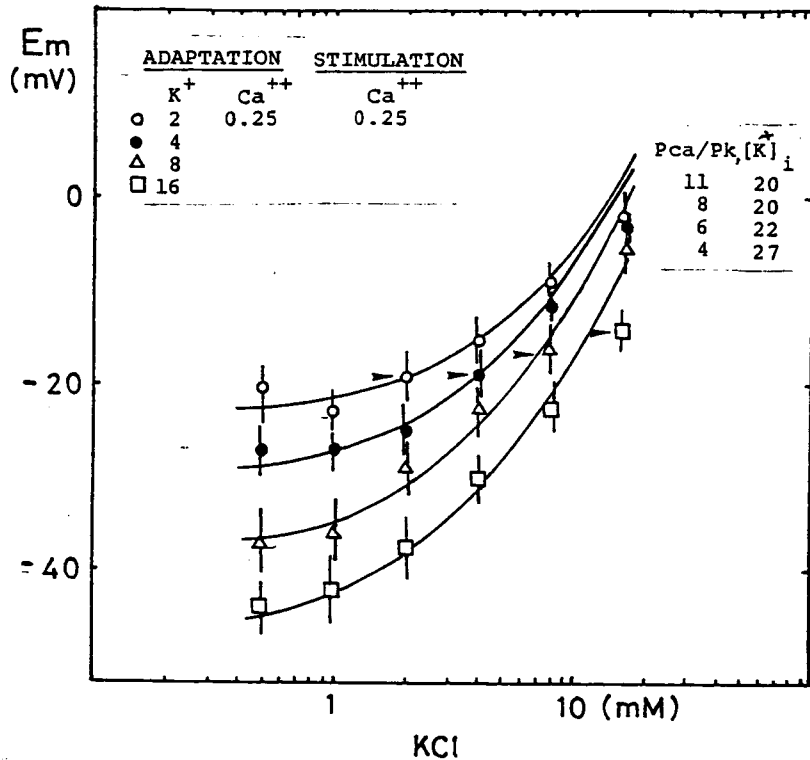


Fig 18 $[K^+]_{adapt}$ の異なる細胞の膜電位の $[K^+]_o$ 依存性の Goldman eq. による simulation

Fig 11 の結果を次の Goldman の式に fitting した。

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_k [K^+]_o - P_k [K^+]_i + \sqrt{A}}{2P_k [K^+]_i + 8P_{ca} [Ca^{++}]_i}$$

$$A = (P_k [K^+]_i - P_k [K^+]_o)^2 + 4(P_k [K^+]_o + 4P_{ca} [Ca^{++}]_o) \times (P_k [K^+]_i + 4P_{ca} [Ca^{++}]_i)$$

... (5)

ただし $[Ca^{++}]_o = 10^{-8} M \sim 0$ で省略できる。

グラフに示す P_{ca}/P_k , $[K^+]_i$ の値で曲線を求めた。

ただし P_k ; K^+ の透過係数, P_{ca} ; Ca^{++} の透過係数

$[K^+]_i$; 細胞内 K^+ 濃度, $[K^+]_o$; 外液 K^+ 濃度

$[Ca^{++}]_i$; 細胞内 Ca^{++} 濃度, $[Ca^{++}]_o$; 外液 Ca^{++} 濃度

F ; Faraday 定数, R ; 気体定数

T ; 絶対温度

この時の chord conductance は,

$$g_k = -\frac{EmF^2}{RT} P_k \frac{[K^+]_i - [K^+]_o \exp(-EmF/RT)}{\exp(-EmF/RT) - 1} / (Em - E_k) \quad \dots (6)$$

$$g_{ca} = -\frac{4EmF^2}{RT} P_{ca} \frac{[Ca^{++}]_i - [Ca^{++}]_o \exp(-2EmF/RT)}{\exp(-2EmF/RT) - 1} / (Em - E_{ca})$$

ただし Em ; 膜電位, E_k ; K^+ の平衡電位 $\dots (7)$

E_{ca} ; Ca^{++} の平衡電位

となる。

実験条件では $[Ca^{++}]_i \sim 10^{-8} M$, $[Ca^{++}]_o = 0.25 mM$,
 $20 mM \leq [K^+]_i \leq 25 mM$, $2 mM \leq [K^+]_o \leq 16 mM$ なる
 ので $[Ca^{++}]_i$ は省略でき (5) 式は次の様に表わせる。

$$Em = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o - [K^+]_i + \sqrt{B}}{2[K^+]_i} \quad \dots (8)$$

$$B = ([K^+]_i - [K^+]_o)^2 + 4[K^+]_i ([K^+]_o + 4 \frac{P_{ca}}{P_k} [Ca^{++}]_o)$$

この (8) 式に電位が Fig 11 の実験結果に最も近づくような P_{ca}/P_k , および $[K^+]_i$ の値を選び代入すると Fig 18 のようになる。ただし $[K^+]_i$ は実験値に近い値を用いた。この結果は、ごく高い K^+ 濃度でのすゝを除けば実験結果とよく一致する。

いま $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞と $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞とを比較してみると、用いた P_{Ca}/P_K の値は、前者が後者の約 0.56 倍である。この値を (6)(7) 式を用いて conductance の比 g_{Ca}/g_K として書き直すと、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ の条件で適応させて濃度 $[K^+]_{adapt} = 8 \text{ mM}$ の時、 $g_{Ca}/g_K = 0.07$ 、 $[K^+]_{adapt} = 2 \text{ mM}$ の時 $g_{Ca}/g_K = 0.11$ となる。したがって $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞は $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞に対し、 g_{Ca}/g_K の値が約 0.63 倍となる。すなわち、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した時の方が、 g_K が大きくなるか、あるいは、 g_{Ca} が小さくなるかのいずれかであることになる。

ゾウリムシの静止電位を決定する膜の conductance は、主に K^+ conductance であるので、上述の膜抵抗の変化は、主に g_K の変化によると考えてみよう。conductance は、input resistance の逆数なので Table III から conductance の変化を計算すると $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応したゾウリムシの方が、1.67 倍だけ $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応したものより大きくなっている。この変化は g_K の変化のみによるとみなすと、 g_{Ca}/g_K の値の変化は $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞が $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応したものの 0.60 倍になり先の値 0.63 倍とかなり近い値になる。したがって $[K^+]_{adapt} = 8 \text{ mM}$ の細胞は $[K^+]_{adapt} = 2 \text{ mM}$ の細胞に比べ g_K の値が約 1.6 倍上昇したことになる。そうすると高い K^+ 濃度に適応している細胞の方が静止電位が深くなるという結果は主に g_K が大きくなったことによるとしてうまく説明できる。また K^+ 濃度の低い液に移された時に電位の深くなる程度は g_K が大きいほど大きくなる。

これらの結果よりイオン環境適応の過程は次の様に要約できる (Fig 19)

$$E_m = \frac{1}{G} \left(g_k \frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_o}{[K^+]_i} + g_{Ca} \frac{RT}{2F} \ln \frac{[Ca^{2+}]_o}{[Ca^{2+}]_i} \right)$$

Adaptation: $[K^+]_A < [K^+]_B$
 $[Ca^{2+}]_A = [Ca^{2+}]_B$

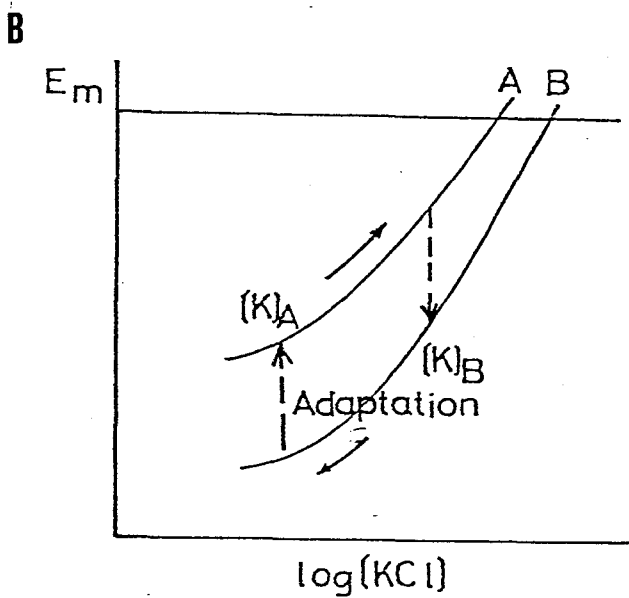
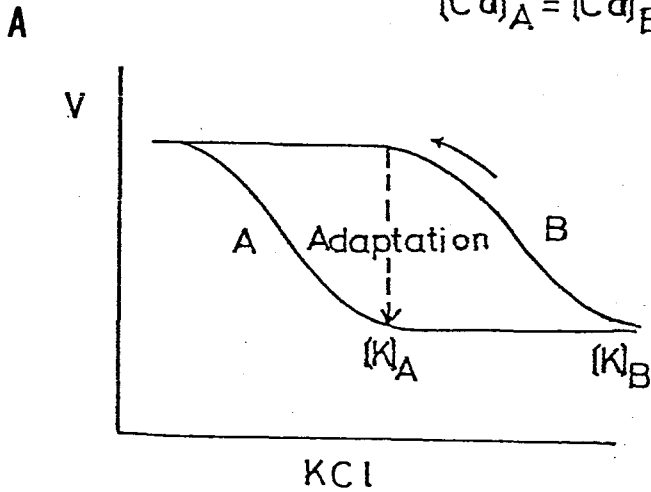


Fig 19

ノウリムシのイオン適応の過程を示す模式図

Aは遊泳速度を指標とした行動適応を示す。外液 K^+ 濃度 $[K^+]_o$ に適応した細胞は $[K^+]_A$ に K^+ 濃度を下げるとBの曲線に沿って加速の状態に移る。数時間後 $[K^+]_A$ に適応すると、速さは定常の値にもどる。この時の遊泳速度の K^+ 依存性はAの曲線となる。

Bは、この適応の際の膜電位の変化を示す。 $[K^+]_B$ に適応した細胞を $[K^+]_A$ に移すと過分極するが、適応していくともとの膜電位に近づいていく。すなわち、Homeo-Membrane Potentialの形で適応していく。この適応の際、主に変化しているのは g_k と考えられる。

適応した K^+ 濃度より低い K^+ 濃度の環境に移された細胞は膜電位が過分極すると共に加速の遊泳行動をとる。その環境に適応してくると、 g_K が減少して電位が脱分極向きに変化して泳ぎの速度が定常状態に回復してゆく。反対に外液の K^+ 濃度を高めると膜電位は脱分極して遊泳速度は少しだけ減少するが、再適応が進むにともない g_K が増大して電位が過分極方向に変化し、遊泳速度はもとの状態に回復する。ここでみた実験結果から K^+ 濃度変化に対する適応が主に、 g_K の変化によって起こることが示されたが、他のカチオンの濃度を变化させた場合も g_K の変化によって適応するののかどうかは興味ある問題であるが、これに答えるにはさらに多くの実験が必要である。

ところで加速遊泳の原因は何であろうか。

最近細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が泳ぎの加速を引き起こすことを示す結果が得られている。すなわち Triton X-100 処理により膜の選択的透過性が破壊されたモデルによる実験 (Tanaka 1982) から繊毛打逆転の起こる Ca^{2+} 濃度より少し低濃度の $pCa \sim 7$ で繊毛打頻度の増大と遊泳速度の上昇が観察されている。定常状態での Ca^{2+} 濃度は $pCa \sim 8$ と推定されるので細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が加速を起こすと予想される。又加速遊泳を行なっている細胞は顕著に尾部が収縮しており、この現象も細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇していることを示唆している。

上に述べたように、外液の K^+ 濃度が低いか、または Ca^{2+} 濃度が高い条件で遊泳の加速がおこるが、この条件では、膜を通して流れる内向 Ca^{2+} 電流が上昇する。すなわち、膜をよぎって流れる K^+ , Ca^{2+} 電流を I_K , I_{Ca} とおくと、定常状態では、全体として膜を通して流れる電流はないので、

$$I_{\text{total}} = g_k (E_m - E_k) + g_{\text{ca}} (E_m - E_{\text{ca}}) = 0 \quad \dots (9)$$

と書ける。これより

$$E_m = \frac{g_k E_k + g_{\text{ca}} E_{\text{ca}}}{g_k + g_{\text{ca}}} \quad \dots (10)$$

これを用いて

$$\begin{aligned} -I_{\text{ca}} &= g_{\text{ca}} (E_m - E_{\text{ca}}) \\ &= \frac{g_k g_{\text{ca}}}{g_k + g_{\text{ca}}} (E_k - E_{\text{ca}}) \\ &= I_k \quad \dots (11) \end{aligned}$$

と書ける。この関係は、 K^+ 濃度が減少するか、 Ca^{++} 濃度が増大すると I_{ca} の絶対値が大きくなる事を示している。

このようにして Ca^{++} が流入し、細胞内 Ca^{++} 濃度がわずかに上昇することが遊泳の加速をひきおこすものと考えられる。

そして適応にともない、 g_k が変化し膜電位がもとにもどると Ca^{++} の流入は減少し細胞内 Ca^{++} の濃度は再び減り、正常の遊泳状態になるのである。

第四章 膜電位振動現象と游泳速度の調節

§1 緒言

ゾウリムシの游泳速度は、繊毛打頻度、繊毛打の角度、繊毛打の協調性等の一関係して変化すると考えられる。その中で特に重要な役割を果たしている繊毛打頻度は、内向電流刺激又は、膜電位固定下で過分極することにより増大する。この繊毛打頻度の増大は過分極の場合だけでなく、脱分極による繊毛打逆転時にも見られる。(Machmer 1974, Eckert & Machmer 1975)そして前章の終りで述べたように Ca^{2+} の細胞内濃度の上昇が泳ぎの加速をおこすと考えらる。

ところでゾウリムシの泳ぎの速度が加速されるような条件下、たびたびその膜電位が振動する現象がみられた。この電位振動も Ca^{2+} の流入によるのではないかと思ふ。本章では、その電位振動の性質について述べる。

§ 2. 実験結果

2-a 環境適応と膜電位振動現象

3章でみた様に、ゾウリムシを適応させたよりも低い K^+ 濃度の溶液に移すと、その遊泳速度が加速した状態になる。この条件で膜電位を測定すると、しばしば過分極性

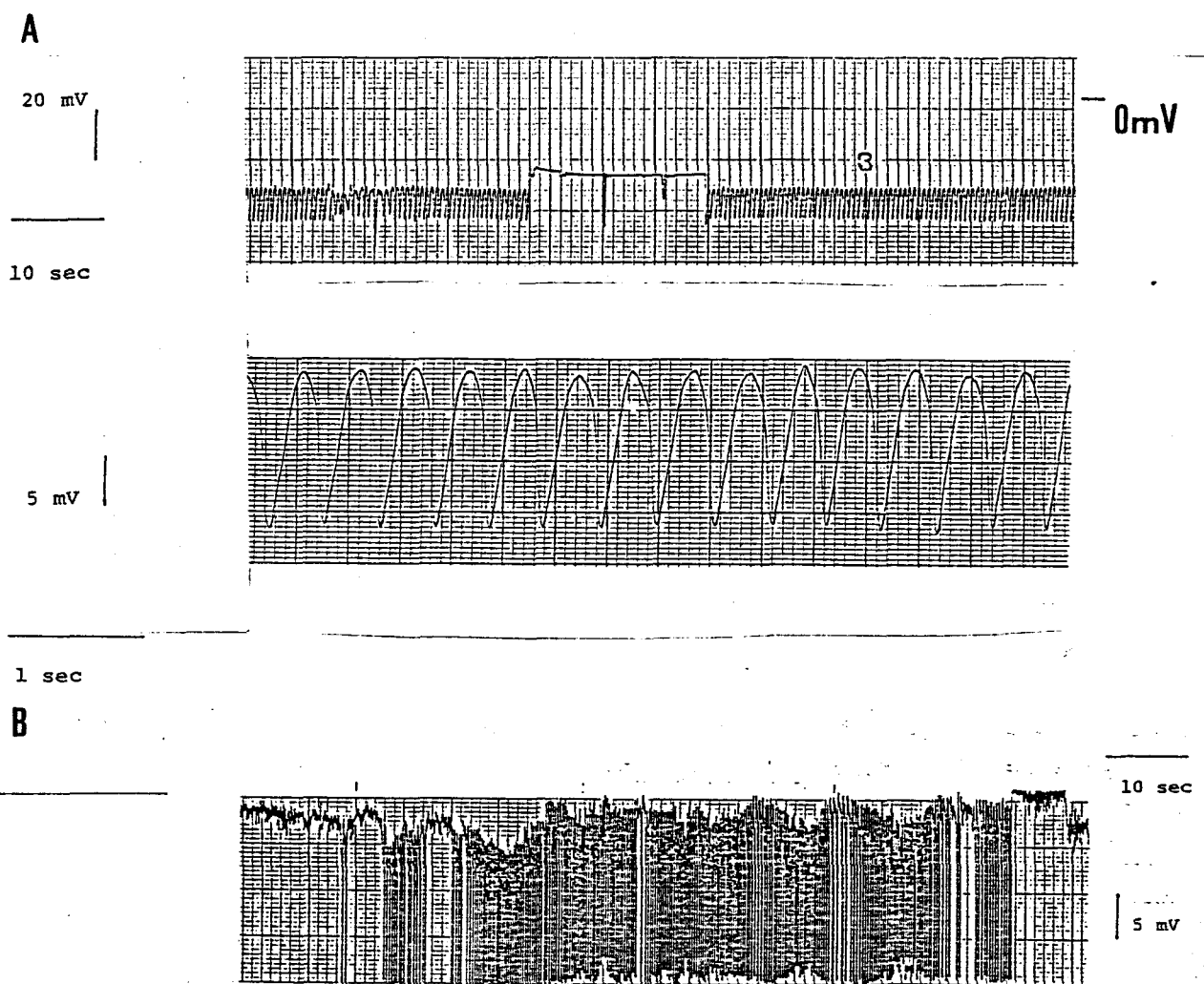


Fig 20 ゾウリムシの過分極性膜電位振動現象。

A. $[K^+]_{adapt} = 2 \text{ mM}$, $[K^+]_0 = 0 \text{ mM}$ の加速の条件で誘発される過分極性膜電位振動現象

B 膜電位がゆるいである場合の振動周期は膜電位に依存して変化する。

膜電位振動現象が観察される。(Fig 20) この時の振幅は、 $15 \sim 25 \text{ mV}$ でその周波数は平均 $2 \sim 3 \text{ Hz}$ である。

ただし Fig 20 の B 図にみられる様に静止電位がゆらいでいる場合過分極向きにずれる時に周波数が高くなり、脱分極向きにずれるとき、低くなる様な電位依存性がある。この時の振動波形は、過分極向きに変化する時の電位変化のほやさの方が静止電位にもどる時よりも大きい、すなわち時間非対称的な形をしている。

このような過分極性膜電位振動現象は、適応液に対し K^+ 濃度を一定に保ち、 Ca^{++} 濃度を上昇させた時にも観察される。特に顕著に見られるのは、高い K^+ 濃度に適応させたソウリムシを K^+ -free の溶液中に移した場合である。

また多くの場合適応している値より外液の Ca^{++} 濃度を上昇させると、振動現象が誘発されるが、振動現象が起こらない場合も、外向電流を流すことにより、膜電位を脱分極させると、徐々に過分極性スパイクが誘発され、やがて膜電位振動に移行する (Fig 21) しかし外向電流を切ると振動は消滅する。

再び外向電流を流すとただちに振動状態が回復する。反対に、内向電流を流して膜電位を過分極向きに動かさせても、振動現象は誘発されない。

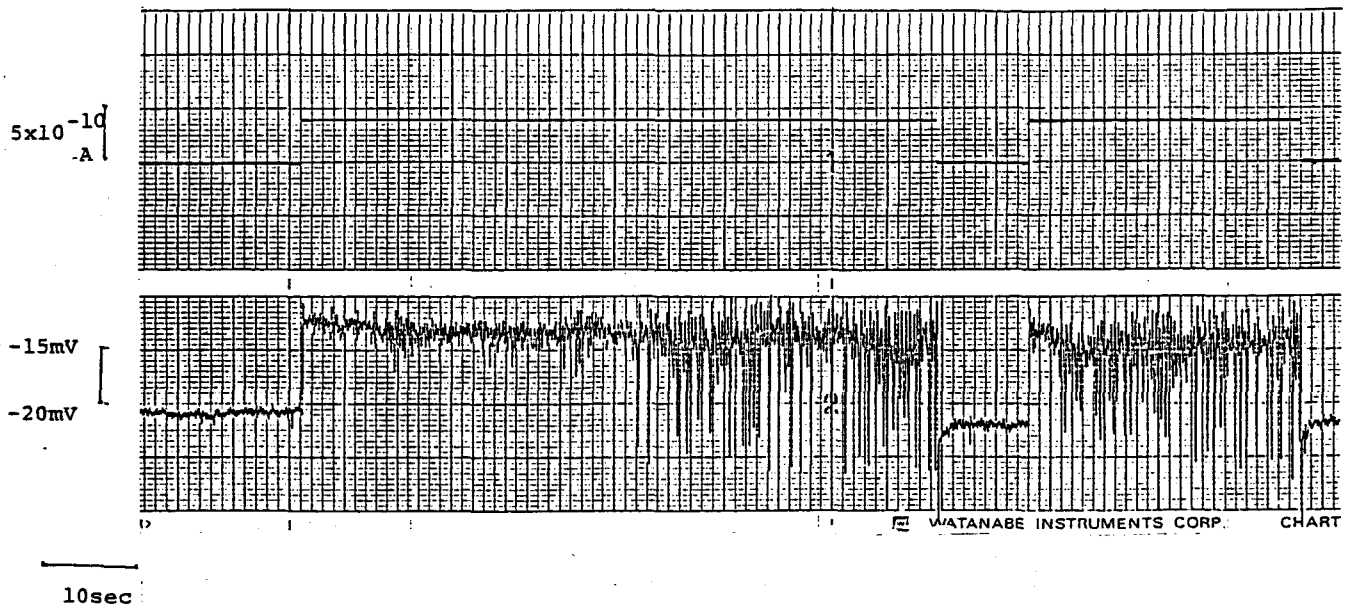


Fig 21 電流固定法による膜電位振動現象の誘発

培養液から CaCl_2 16 mM, KCl 2 mM, TrisHCl pH 7.2

1 mM の溶液に移した細胞を 0.4 nA の外向電流固定した。

2-b 膜電位振動時の膜の性質

膜電位振動中の膜の性質を調べるために、膜電位固定法を用いて実験を行った。(Fig 22)

その結果膜電位振動している条件で 膜電位を

静止電位に固定すると、振動状態は消えるが、この時過分極パルスを入力した場合、一過性の外向電流が発生することを見つけた。この外向電流のために、静止電位より過分極側で負性抵抗を示す I-V 関係が得られた。

次にこの外向電流と細胞内 Ca^{++} 濃度との関係を調べるために、脱分極 70L パルスを与えて細胞内に Ca^{++} を流入させた後 I-V 曲線を測定した (Fig 23) その結果、この一過性の外向電流は 70L パルスによって、

G-3 (log phase)

Adapt Ca; 0.25 Sol Ca; 0.25

○ early

● late

Vh = -35mV

Adapt Ca; 0.25 Sol Ca; 1

△ early

▲ late

Vh = -30mV

4 nA, 20 mV

40 ms

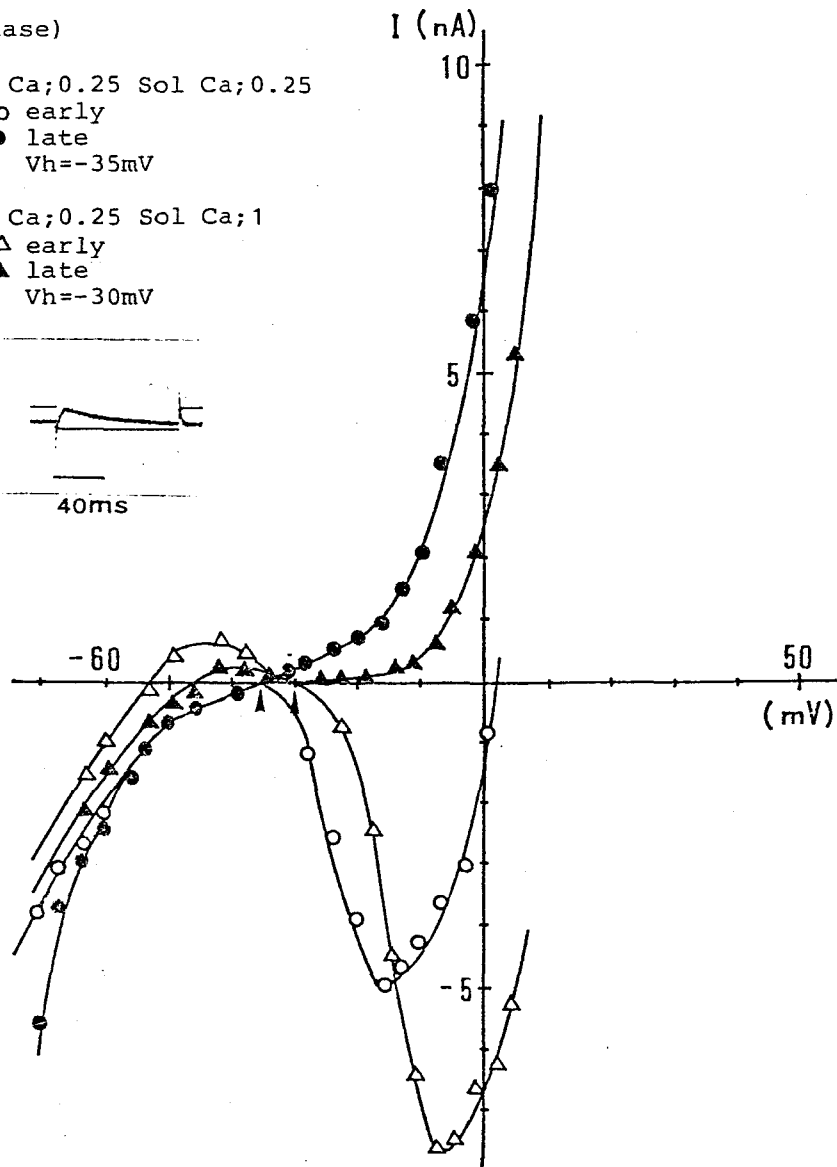


Fig 22 I-V 曲線の $[Ca^{2+}]_o$ 依存性

$CaCl_2$ 0.25 mM に適応した細胞を適応溶液中及び $CaCl_2$ 1 mM の液に移し、膜電位振動が誘発された際の I-V 曲線を示す。固定膜電位は、それぞれ溶液中での静止電位である。(矢印)

溶液は Ca^{2+} 以外は、KCl 2 mM, Tris-HCl pH 7.2 1 mM で共通である。グラフ内の波形状は、 Ca^{2+} 1 mM の溶液中で

過分極パルスを入力した際、観られる一過性外向電流を示す。

early は、この電流のヒール値、脱分極側は、 Ca^{2+} 電流のヒール値を示す。late は、50 msec パルスの最後の時点での値を示す。

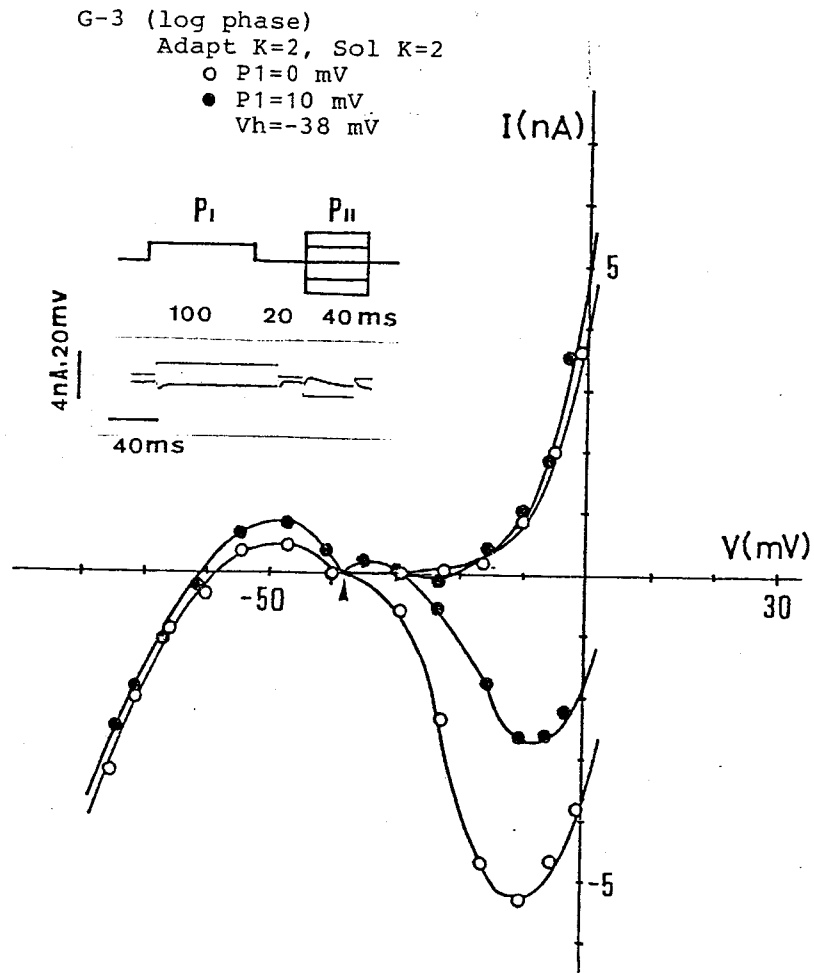


Fig 23 膜電位振動中の細胞の I-V 曲線の フレ・パルス
 依存性.

細胞が膜電位振動を誘発された際、静止電位 -38 mV に膜電位固定した。グラフは、過分極 フレ・パルスが存在 (ない時 (○) とする時 (●)) のオムパルスの電流・電圧関係を示す。図中に示す波形はフレ・パルスが存在する際の過分極オムパルスで観察される一過性外向電流を示す。I-V 曲線の過分極側は、この一過性外向電流のヒーク値に相当する値をプロットした。

さらに増強され、大きくなることが分った。この場合、脱分極時の Ca^{2+} の内向電流は、脱分極 $70L$ ・パルスを与えると部分的に不活性化され小さくなる。一方脱分極時の外向 K^+ 電流は、 $70L$ ・パルスによる Ca^{2+} 流入で明らかに増加の傾向を示す。

§ 3. 考 察

ここでみた電位振動の性質は、振動現象が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって引き起こされることを示していると考えられる。

その理由の1は、振動現象が外液 K^+ 濃度が低い、 Ca^{2+} 濃度が高い条件で発生することである。

その理由の2は、膜をいったん脱分極させて細胞内に Ca^{2+} を流入させた後には膜電位振動が発生し易いという点である。

その理由の3は、振動時に、膜電位固定した場合に特徴的にみられる負性抵抗が外液の Ca^{2+} 濃度を高くするが、いったん脱分極パルスを加えて Ca^{2+} を流入させた後に、より顕著になる事である。

ここでみた様な膜電位振動現象は、培養した細胞でも観察されており、この振動が細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇による Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルの活性化によって誘導されていることが報告されている。(Okada et al. 1981, 1982)

膜電位がなぜ振動状態になるのかという点については、 Ca^{2+} 流入と、 Ca^{2+} ポンプによる排出との間に起こる細胞内 Ca^{2+} 濃度の振動が Ca^{2+} 依存性 K^+ チャネルによって増強されていると考えられている (Okada et al 1982)

また、ここでみた振動条件での負性抵抗は、アplysia (Aplysia) などでも観察されており、振動現象との関連が予想されている。

第五章 環境適応にともなう膜の興奮性の変化

§ 1 緒言

ゾウリムシの 繊毛打逆転とそれにともなう後退遊泳は、膜が脱分極することにより興奮性 Ca チャンネルが開き Ca^{++} が 繊毛内に流入してその濃度が $10^{-6} M$ 以上に高まることによつて引き起こされることが示されている。(Naitoh 1968, Naitoh & Eckert 1968, 1969, Machemer & Eckert 1973) この繊毛打逆転運動は、電流刺激による脱分極によつても又、急に高い K^+ 濃度の外液にさらすこと (K^+ 刺激) によつても引き起こされる。(Fig 24)

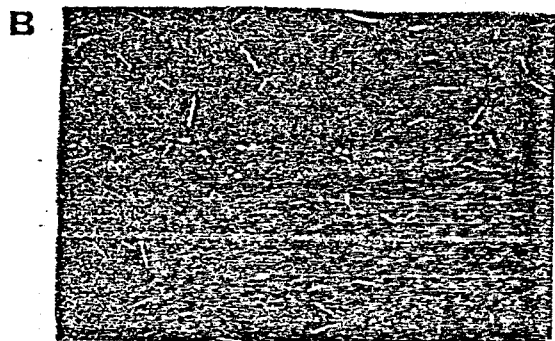


Fig 24

A K^+ 刺激による後退遊泳
適応状態に応じて後退
遊泳が持続する。

B 後退遊泳の後、細胞
はスピンスし、その後図に
示す様な定常速度の
前進遊泳を行なう。

露出時間は5秒

10mm

しかし、これらの繊毛逆転運動は、電流刺激あるいは、 K^+ 刺激を続けているも、(たゞいにおさまリ、やがて回転運動をした後、前向きの正常な遊泳にこだる。

(Kinoshita 1954, Machemer & Eckert 1975)

この回復は流入した Ca^{++} が Ca^{++} ポンプによつてくみ出されその濃度が減少することによると考えられている。(Eckert & Naitoh 1972)

K^+ 刺激による繊毛逆転または後退運動の持続時間は刺激液中の K^+ , Ca^{++} の濃度の比 $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ の値によつて決められ、この値が大きいほど時間が長くなることが示されている。(Kamada & Kinoshita 1940, Jahn T.L. 1962)

またこの時間は、はじめ適応している環境のイオン濃度にも依存しており、適応した液の $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ の値が小さいほど一定の K^+ 刺激による後退時間は長くなる。後退時間が $[K^+]/\sqrt{[Ca^{++}]}$ の値で決まることの納得のい説明は未だない。しかしながら、 K^+ 刺激による後退時間の長さは、膜興奮にともなひ開いた Ca チャンネルから細胞内に流入する Ca^{++} の量と関係していると考えられる。そうすると適応したイオン条件によつて後退時間が変わるといふ事実は、興奮にともなひ Ca^{++} の流入量が適応条件によつて変化していることを予想させる。そこで Ca^{++} 流入量が適応にともなひどの様に變化し、調節されているのかを明らかにするために次に述べる実験を行つた。

§ 2. 実験と結果

2-a 行動学的環境適応

K^+ 濃度が 2mM の溶液に適応している細胞を $[K^+] = 32\text{mM}$ を含む溶液に移かえると、移かえた直後から約50秒間後退遊泳を続ける。 K^+ 濃度が 8mM の溶液に適応している細胞では、同じ K^+ 刺激による後退遊泳時間は、約20秒であった。そこでこの後退遊泳時間を指標として再適応の過程を調べた。すなわち K^+ 濃度が 8mM に適応した細胞を K^+ 濃度 2mM の溶液に移した後

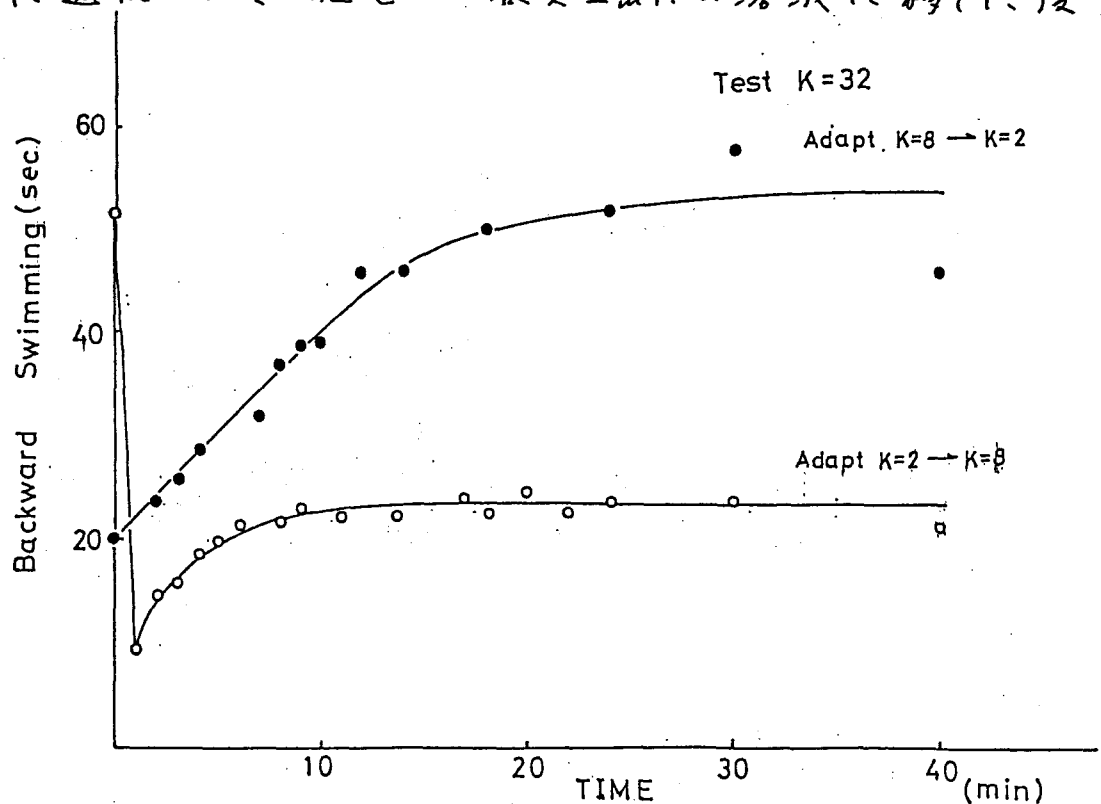


Fig 25 後退遊泳時間を指標とした細胞の再適応過程

縦軸は試馬溶液 (KCl 32mM , $CaCl_2$ 0.25mM , $Tris \cdot HCl$ $pH 7.2$ 1mM) 中での後退遊泳持続時間を示す。 $(K^+) = 8\text{mM}$ に適応した細胞を $[K^+] = 2\text{mM}$ に再適応させ始めた時からの時間経過; (●), $[K^+] = 2\text{mM}$ に適応した細胞を $[K^+] = 8\text{mM}$ の液に移し再適応させ始めた時からの時間経過を示す。

いろいろな時間に K^+ 刺激を行ない、後退遊泳時間を測定する。その結果 Fig 25 に示したように、約 30 から 40 分で新しいイオン環境に適応した値に近い後退遊泳時間を示す。逆に、 K^+ 濃度 $2mM$ の溶液から $8mM$ の溶液に移した後の再適応の過程を調べると、後退遊泳時間は、はじめ急激に減少した後、数 10 分で増大して $8mM$ のイオン環境に適応した時と同じ後退遊泳時間を示すことがわかる。はじめの急激な後退遊泳時間の減少は、 K^+ 濃度を $2mM$ から $8mM$ に移した際に、一度膜は興奮を起し、後退遊泳を行なうが、この時すぐに強い K^+ 刺激を加えて再び興奮を起しにくいことを意味する。即ち $[K^+] = 2mM$ から $8mM$ への適応過程は、はじめに起きた不活性化が、くりと解除される過程を反映していると考えられる。

2-b 膜電位固定法による環境適応の解析

2-b-1 環境適応にともなう I-V 曲線の変化

前節での行動でみた環境適応は、膜のどのような性質の変化によるのか膜電位固定法を用いて調べた。まず、 K^+ 濃度が $2mM$ の溶液に適応した細胞の I-V 曲線を外液の K^+ 濃度を変えて測定した。測定外液 K^+ 濃度が適応した濃度よりも高いと静止膜電位は、脱分極する。さらに、 Ca^{++} によると考えられる一過性内向電流の Ca^{++} を抑制されてくる。一方 K^+ 濃度が $8mM$ の溶液に適応した細胞は、測定外液 K^+ 濃度を減少

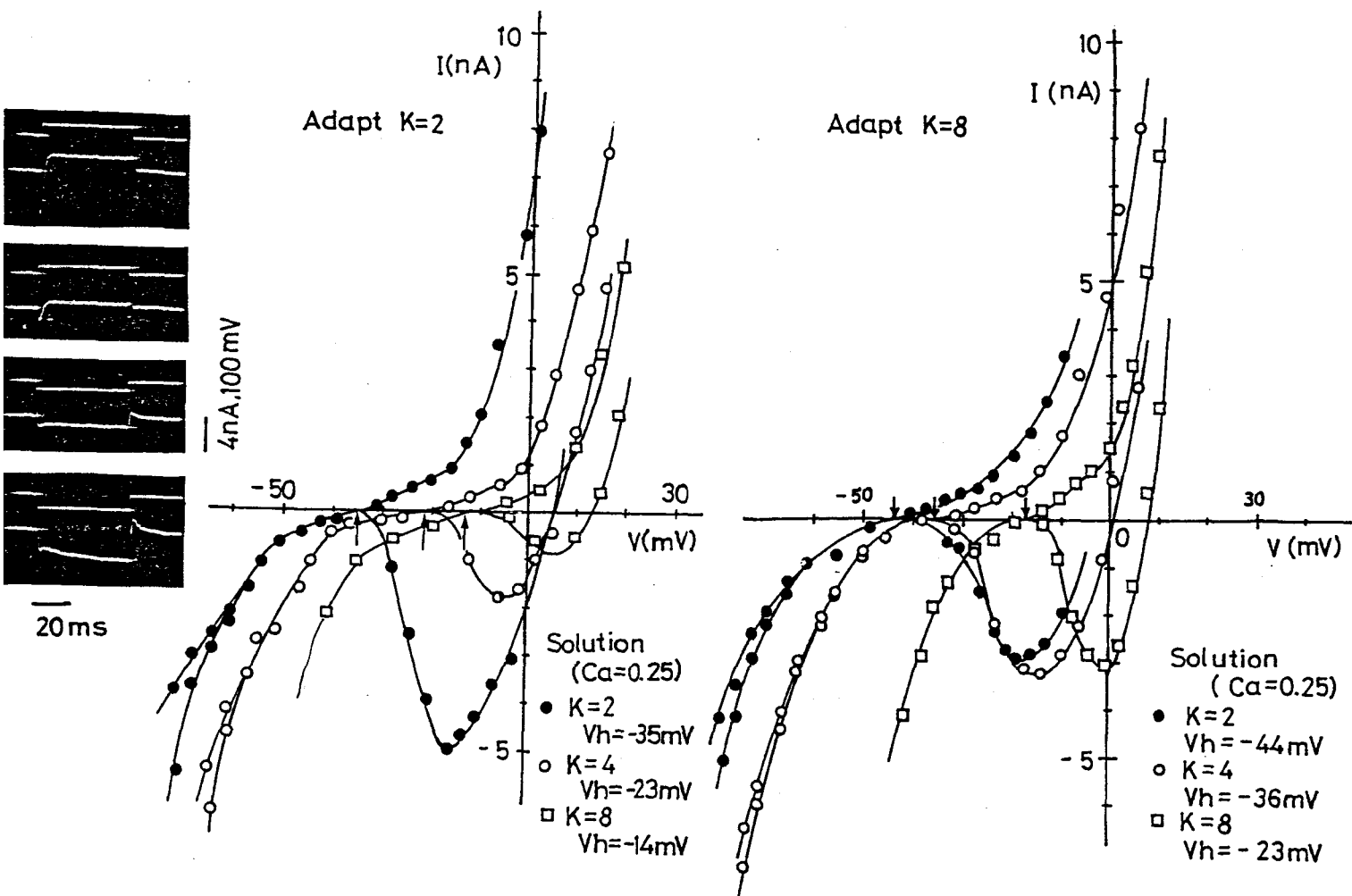


Fig 26 適応 K^+ 濃度の異なる細胞の $I-V$ 曲線の $[K^+]$ 依存性
 左図は、 $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞の $[K^+]$ を変化させて、
 $I-V$ 曲線を求めたものである。右図は、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応
 した細胞のものである。それぞれの測定溶液中で、静止
 電位 (矢印) に膜電位固定し、50 msec の pulse を command
 に入れ、 $I-V$ 曲線を求めた。脱分極方向では、約 2.5 msec
 での内向 Ca^{++} 電流の peak 値と 50 msec の時点で
 外向 K^+ 電流をプロットした。過分極方向では、異常
 整流が起る時には、内向電流の最大値と最小値を
 プロットした。

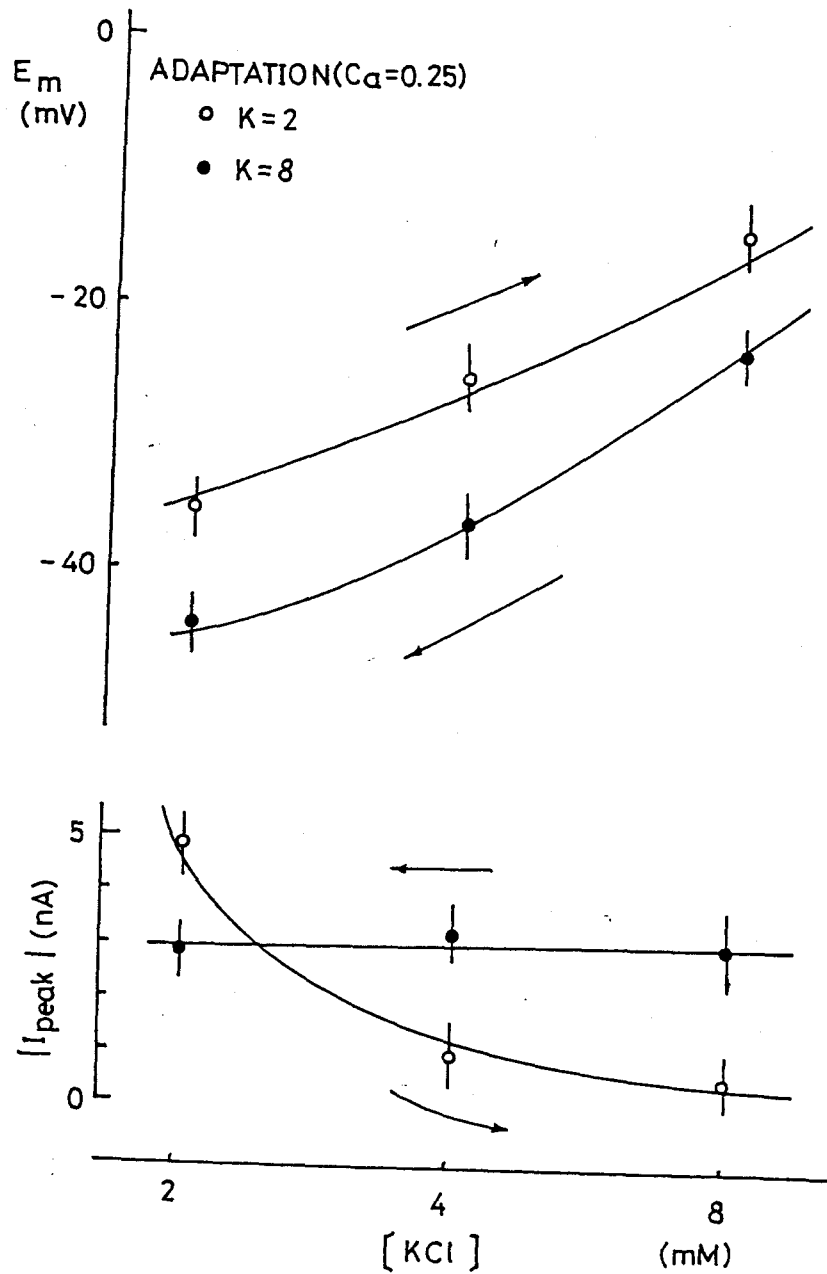
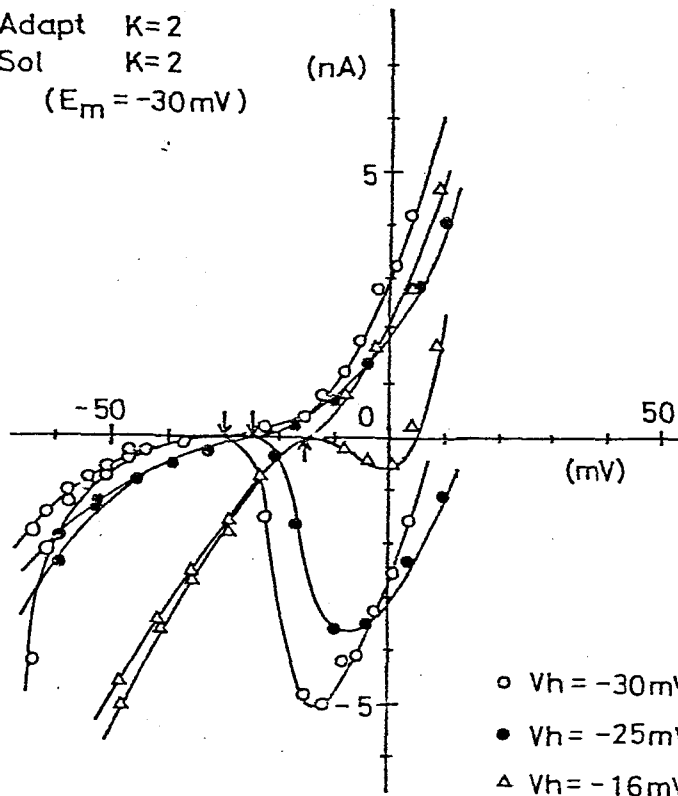


Fig 27 適応にともなう膜電位変化と Ca^{2+} の一過性内向電流変化
 上は静電位, 下は Ca^{2+} の内向電流の絶対値を示す。
 横軸は測定溶液の K^+ 濃度である。
 ○ は $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞の場合
 ● は $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞の場合
 Ca^{2+} 濃度はすべて 0.25 mM

させると膜の静止電位は過分極するが、 Ca^{2+} の一過性内向電流の $I-V$ 値は、ほとんど変化ない。

これらの関係を整理し直したものが Fig 27 である。静止電位は第三章でも示した様に、測定 K^+ 濃度に対する依存性が適応させた液の条件によって異なり、高い K^+ 濃度に適応した細胞の方が曲線全体が過分極方向にシフトしている。 Ca^{2+} の一過性内向電流については、前述のとおり、それぞれの適応溶液中では、 $[K^+] = 2mM$ に適応した細胞は、 $[K^+] = 8mM$ に適応した細胞の約 1.7 倍の Ca^{2+} 内向電流の $I-V$ 値を持つ。この事は、 K^+ 刺激による後退時間の長さが $[K^+] = 2mM$ に適応した細胞の方が $[K^+] = 8mM$ に適応した細胞の約 2.5 倍である事と変化の傾向は一致する。

Adapt $K=2$
Sol $K=2$
($E_m = -30mV$)



これは、 $[K^+] = 2mM$ に適応した細胞の測定 K^+ 濃度を高くすると、なぜ Ca^{2+} の一過性内向電流が抑制されるのであろうか。それは、静止電位が脱分極したことによるのか、あるいは、 K^+ イオンの特異的な作用によるものか、いづれであるのか調

Fig 28 Ca^{2+} の一過性内向電流の $I-V$ の V_h 依存性

$[K^+] = 2mM$ の溶液に適応した細胞を用いて適応液で測定した。

この時の静止電位は $-30mV$ 、固定膜電位を $-30mV$ (○)、 $-25mV$ (●)、 $-16mV$ (△) とした時の $I-V$ 曲線を示す。

べるために固定膜電位を静止電位から脱分極させて、
I-V 曲線を測定した。その結果 Fig 28 に示すように、
固定膜電位を脱分極させると Fig 26 でみられたような Ca^{2+}
の一過性内向電流の抑制が観察された。したがって
外液 K^+ 濃度を上昇させた時の Ca^{2+} の一過性内向電流
の抑制は、主に膜電位が脱分極したことによると思
われる。

2-b-2 Ca チャネルの不活性化とその回復

前節では、異なる K^+ 濃度の溶液に対する適応に伴い、
 Ca^{2+} の内向電流の大きさが変化している事が示唆された。
そこでこの節では、Double pulse method (Plant & Standen
1981, Akaike et al. 1978, Tillotson 1978, '79, Brehm et al. 1980)
を用いて Ca チャネルの活性化と不活性化がどのように
起っているかを調べた。

まず、異なる K^+ 濃度に適応した細胞が定常状態で
電位依存的に、 Ca チャネルの不活性化がどのように
起こるか調べた (Fig 29)。実験は、それぞれグラフに
示している溶液中で静止電位に膜電位固定し、この
状態で double pulse を command に入力し、第2パルス
を与えた時の膜電流応答を調べた。double pulse 間
の 25 msec の間に第1パルスの外向き K^+ 電流の tail
current は減衰している。グラフの縦軸は、 $[K^+] = 2 \text{ mM}$
に適応した細胞を用いて、適応溶液中で第1パルスを
加えない時の第2パルスでの Ca 内向電流のヒーク値を
1とし、他の条件での値を規格化し、Hodgkin & Huxley
の定常状態の不活性化定数 h_{∞} (Hodgkin & Huxley 1952 a, b)

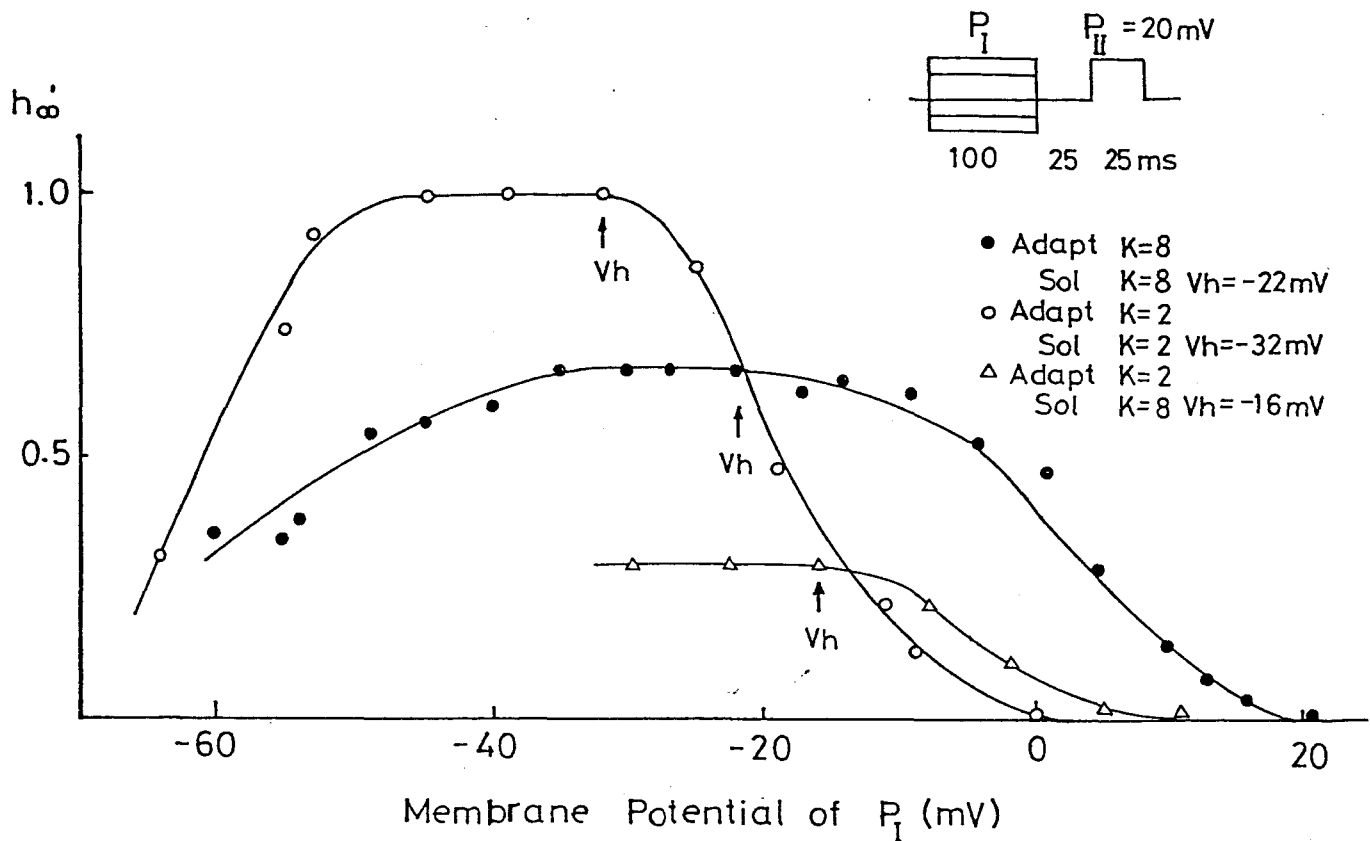


Fig 29 異なる $[K^+]_o$ に適応した細胞の定常状態での Ca チャンネルの不活性化定数 h_{∞} の電位依存性。

100msec の pre-pulse の後 25msec の間隔をあげ、20mV、25msec の脱分極 test pulse を膜電位固定下で command に入力した。pre-pulse の大きさを変化させた時の test pulse での Ca^{++} 内向電流の大きさを pre-pulse = 0mV の時の test pulse の Ca^{++} 内向電流の大きさを h_{∞} と求めた。すべての実験条件での h_{∞} は $[K^+] = 2mM$ に適応した細胞を $[K^+] = 2mM$ 溶液中で測定した時の $h_{\infty} = 1$ の値で規格化している。

横軸は、1パルスの電位を示す。それぞれの細胞は、静止電位に膜電位固定している。

を求めた。ただしこの方法から求まる h_{∞} はオムパルス
の持続時間依存性がある点など理論的な h_{∞} と少し
異なるため h_{∞} と表現した。

この結果 $[K^+] = 2mM, 8mM$ に適応した細胞のいずれ
も脱分極すると Ca チャネルの不活性化が起こる点では、
共通しているが、いずれの静止電位に応じて電位依存性
がシフトしていることがわかる。 $[K^+] = 2mM$ の溶液に
適応した細胞を $[K^+] = 8mM$ の溶液中で測定した場合には、
適応液中と比べ、膜電位が脱分極すると同時に強い不活
性化が起こり、内向電流が減少する。又、この不活性化
曲線自体が少し脱分極側にシフトしてくる。

一方 $[K^+] = 2mM$ の液に適応した細胞が $[K^+] = 8mM$ で
脱分極した後その溶液に適応してくると徐々に膜電位
は過分極の方向に回復してくる。これと同時に Ca チャネル
の不活性化も少しずつ解除され、やがて $[K^+] = 8mM$
の不活性化曲線にのって行く様になる。

2-b-3 Ca チャネルの電位依存性不活性化と Ca 依 存性不活性化。

前節で観察された適応溶液および試験溶液による
 Ca^{2+} 内向電流の変化の原因として次の3つの可能性が
考えられる。

- 1) Ca チャネルの電位依存性不活性化による変化。
- 2) Ca チャネルの Ca 電流依存性不活性化による変化。
- 3) K チャネルの活性化の程度の変化による間接的な
 Ca 電流の変化。

これらの可能性をいづれひとつ検討するために以下の実験を行った。

Ⅰ) Ca チャネルの不活性化の時間経過

まず 1), 2) の可能性について検討するために、 Ca チャネルの不活性化の時間経過を double pulse method により調べた。(Fig 30, 31)

$y_t = I_2 / I_2(0)$ を第 1 pulse の持続時間に対してプロットした Fig 30 は Ca チャネルの不活性化に伴う時間経過を示している。その結果、不活性化の時間経過は biexponential 型になっており、2つの時定数 τ_{h1} , τ_{h2} が求められる。

実験の結果、25mV の脱分極の条件で $\tau_{h1} = 1.9 \text{ msec}$, $\tau_{h2} = 250 \text{ msec}$ であった。これらの時定数は適応させると条件を変えても全く変化しない。

次に、 Ca チャネルの不活性化が解除される時間経過を double pulse method で調べた (Fig 31)。

2つの脱分極 pulse の間隔を徐々に広げていくと、不活性化が解除され、 Ca^{++} の内向電流が回復していくのかわかる。この時間経過は測定した時間間隔内では、1つの時定数 τ のみで表わされた。

実験結果より $\tau = 68 \text{ msec}$ である。この値は、適応条件によって変化しない。

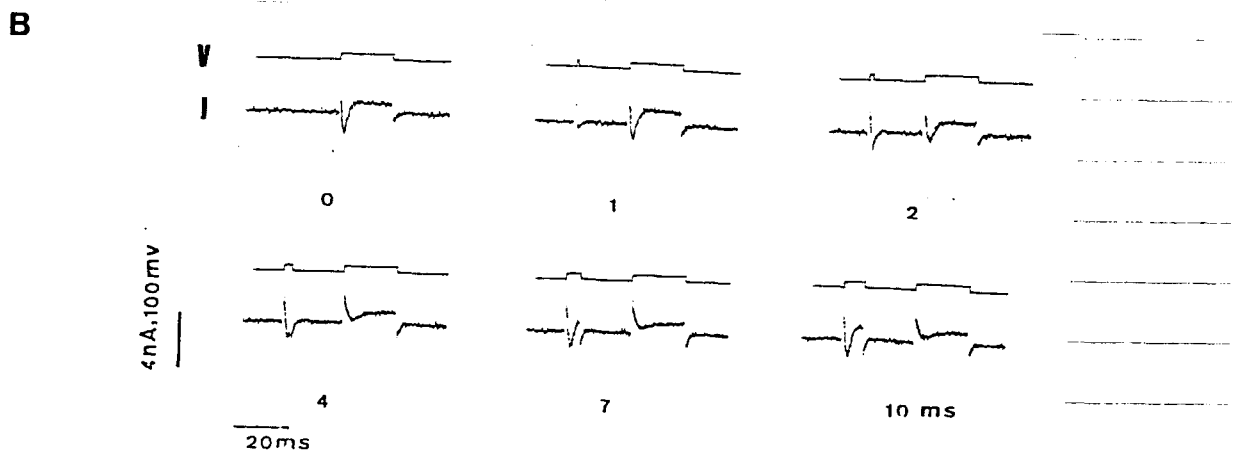
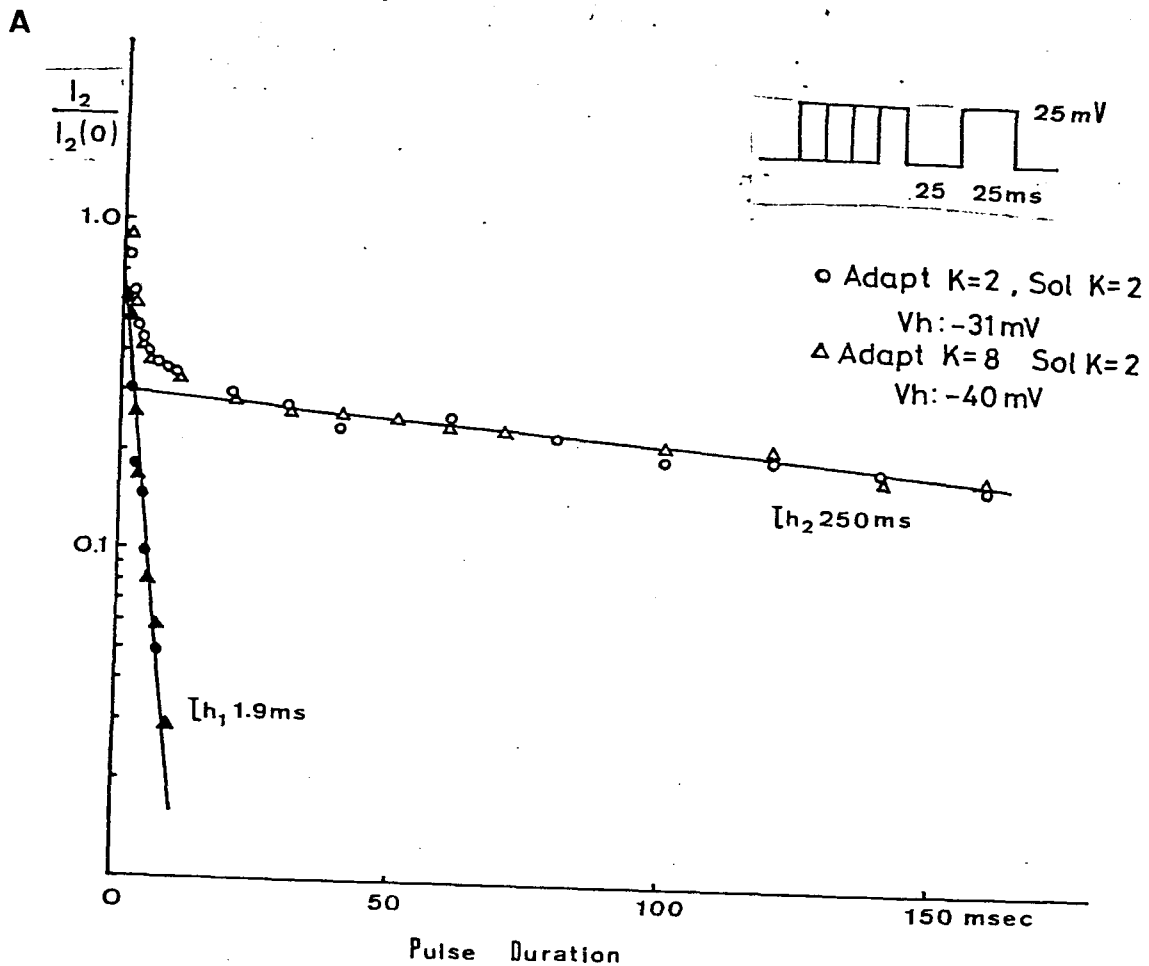


Fig 30 Double pulse method による Ca^{++} 電流の不活性化の起る時間経過。
 静止電位に膜電位固定し、25mVの脱分極 double pulse を入力する。
 第1 pulse の持続時間を変化させ (横軸)、25msec の間隔をとり、
 持続時間 25msec の test pulse での Ca^{++} 内向電流を測定する。
 A 縦軸 $I_2 / I_2(0)$ はそれぞれ第1 pulse の持続時間 での
 test pulse の Ca^{++} 内向電流 I_2 を第1 pulse がない時の値 $I_2(0)$
 で規格化している。
 B. Double pulse による電流・電圧波形
 数字は第1 pulse の持続時間を示す。

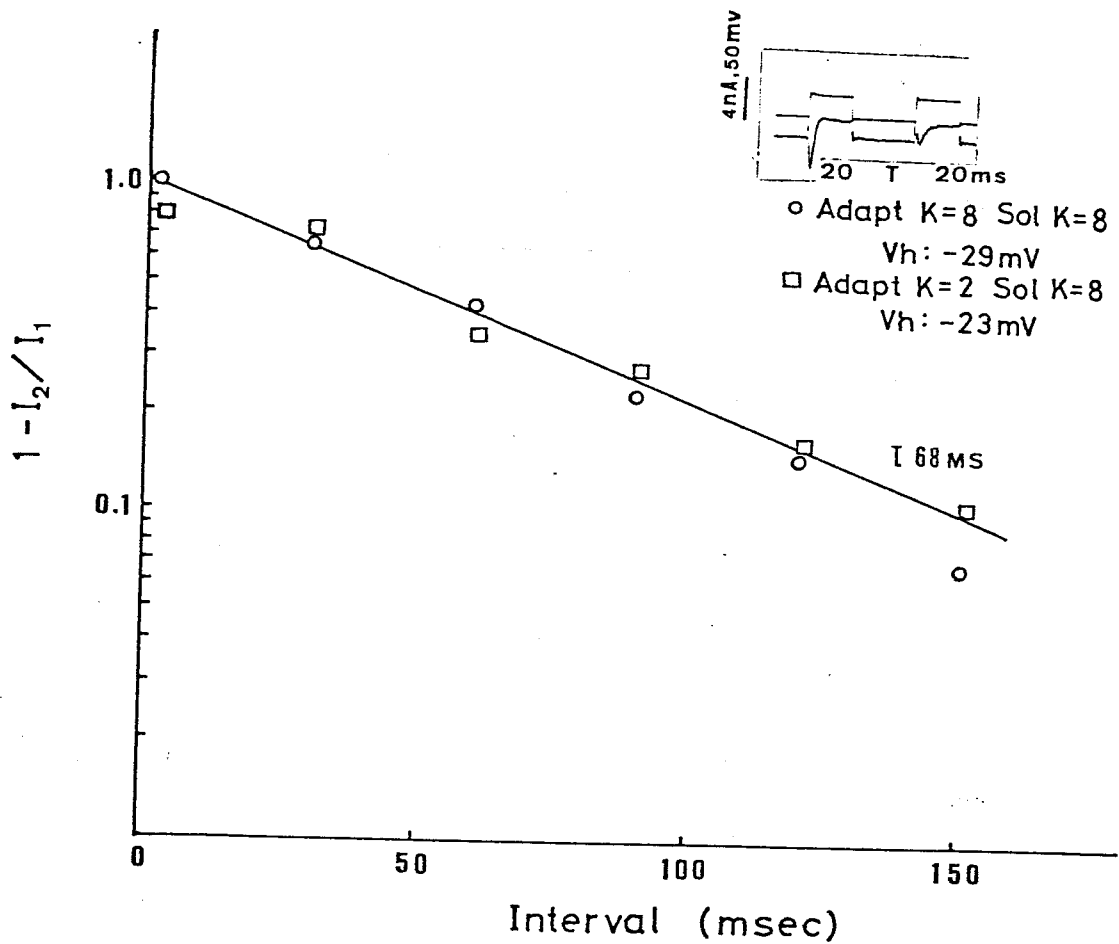


Fig 31 脱分極後の I_{Ca} の回復の時間経過

持続時間 20 msec τ 20 mV の脱分極 double pulse を膜電位固定下で command に入れた。1 pulse τ の Ca^{2+} 内向電流の大きさを I_1 で規格化した値 I_2/I_1 は Ca^{2+} 流入の不活性化の程度を示す。($1 - I_2/I_1$ は完全な回復, $1 - I_2/I_1 = 1$ は完全な不活性化を意味する) 横軸は τ の pulse の間隔である。 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応し、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ で測定している時 (○; 静止電位 -29 mV に固定) $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応し、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ で測定した時 (□; 静止電位 -23 mV に固定) の結果を示す

2) EGTA 微小注射の効果

次に細胞にEGTAを電気泳動的微小注射法 (ionophoretic microinjection) で注入し、 Ca^{2+} 依存性不活性化と電位依存性不活性化の程度を調べた。まずEGTA注入の効果をI-V曲線で調べた。

用いたソリューションは、 $[K^+] = 2\text{mM}$ の溶液に適応しており、この材料を $[K^+] = 8\text{mM}$ の溶液でEGTA注入の効果を調べた。この条件は、Fig 26で見られる様に、 Ca^{2+} の内向電流は非常に抑制されている。この抑制が Ca チャンネルの Ca^{2+} 依存性不活性化によるものであるとすれば、I-V曲線でEGTA注入により、 Ca 内向電流が回復するものと予想される。その結果は、Fig 32に見られる様に、 Ca^{2+} 内向電流はほとんど回復しない。したがって、この Ca 内向電流抑制の過程には、 Ca^{2+} 依存性不活性化はほとんど起っていないと結論できる。すなわち、適応の際に見られる Ca チャンネルの不活性化あるいは、その過程に、 Ca^{2+} 依存性不活性化は、重要な役割を果たしていないと考えられる。

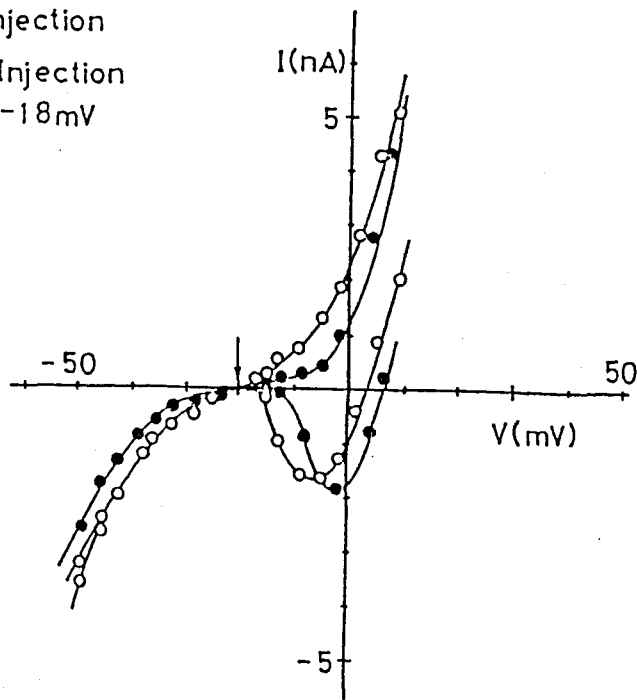
次に、定常状態での Ca チャンネルの不活性化定数 h_{∞} の電位依存性がEGTA注入によりどう影響されるかを調べた。これは、先程のI-V曲線に対するEGTAの効果の実験が、静止状態で活性化できる Ca チャンネル数がEGTAによる Ca^{2+} キレートにより変化するか、すなわち、適応状態で活性化しうる Ca チャンネル数が細胞内 Ca^{2+} 濃度依存的に変化しているかどうか調べているのに対し、この h_{∞} の実験は、一度脱分極刺激により興奮することによりかかる Ca チャンネルの不活性化に、細胞内 Ca^{2+} 濃度依存性がどうか、すなわち、 Ca^{2+} 依存性不活性化が起っているかどうか調べるものである。その結果 (Fig 33) EGTA注入により、脱分極 pre-pulse を加えた場合の Ca チャンネル不活性化

A

Adapt $K=2$

Sol $K=8$

- Pre-injection
 - EGTA-Injection
- Vh: -18mV



B

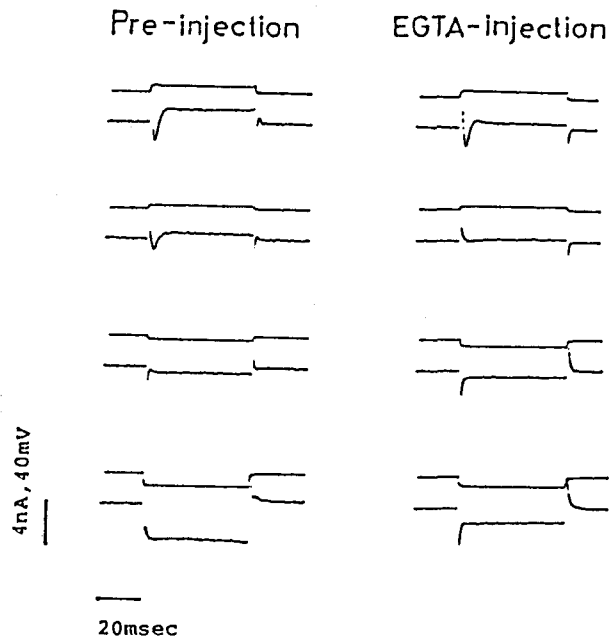


Fig 32 EGTA 微小注射の I-V 曲線への効果

A: $[K^+]_i = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞を $[K^+]_o = 8 \text{ mM}$ の溶液で測定した。EGTA は 10 nA , 1 分間注入した。この時約 10^{-4} M の EGTA が加入していることになる。EGTA 注入前 (○) 後 (●) で固定膜電位は一定としている。

B: EGTA 注入前後での電流・電圧波形を示す。

がかなり解除、されていゝことが分かる。

この事は、EGTAにより、脱分極 pre-pulse 時の流入 Ca^{2+} がキレートされ、その結果、 Ca チャネルの不活性化がかなり、にくくなった事を意味している。

次に Ca チャネルの不活性化の解除、に対するEGTAの効果を実験した。(Fig 34)

その結果、EGTA注入前の回復の時定数が 67 msec であるのに対し、注入後は 23 msec となった。したがって注入前の約3倍の速さで Ca チャネルは再活性化して

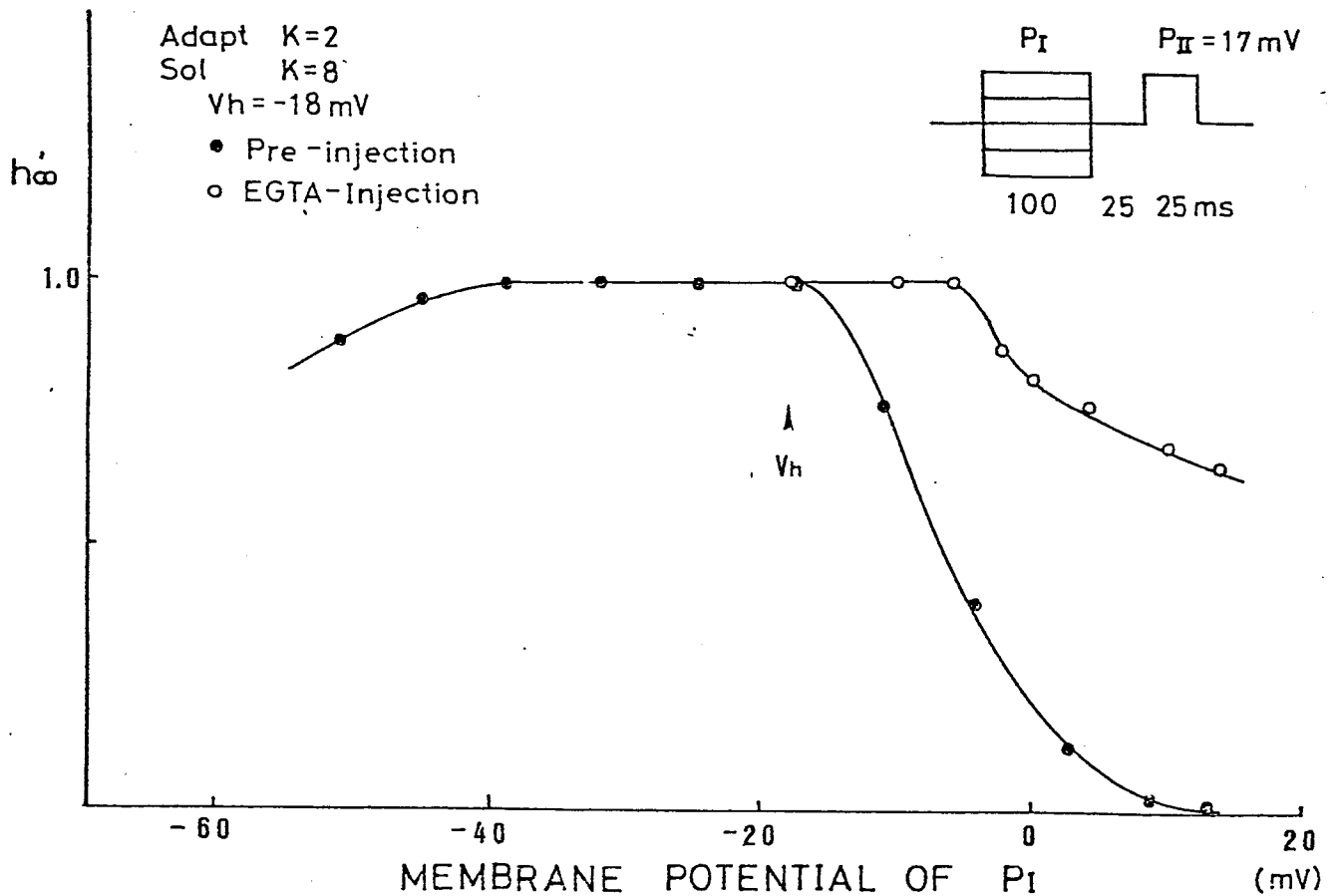


Fig 33 EGTA微小注射による Ca チャネルの不活性化に対する効果
 $[K^+]_{adapt} = 2\text{ mM}$, $[K^+]_o = 8\text{ mM}$ の細胞にEGTAを注射前(●)

後(○)での Ca チャネルの不活性化を示す。

グラフの縦軸、横軸の意味は、Fig 29と同じである。

$[K^+]_{adapt}$; 適応 K^+ 濃度。 $[K^+]_o$; 測定 K^+ 濃度。

くることがわかった。これは、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低く保たれている場合には、 Ca チャネルの再活性化が早まやかに起こる事を意味している。

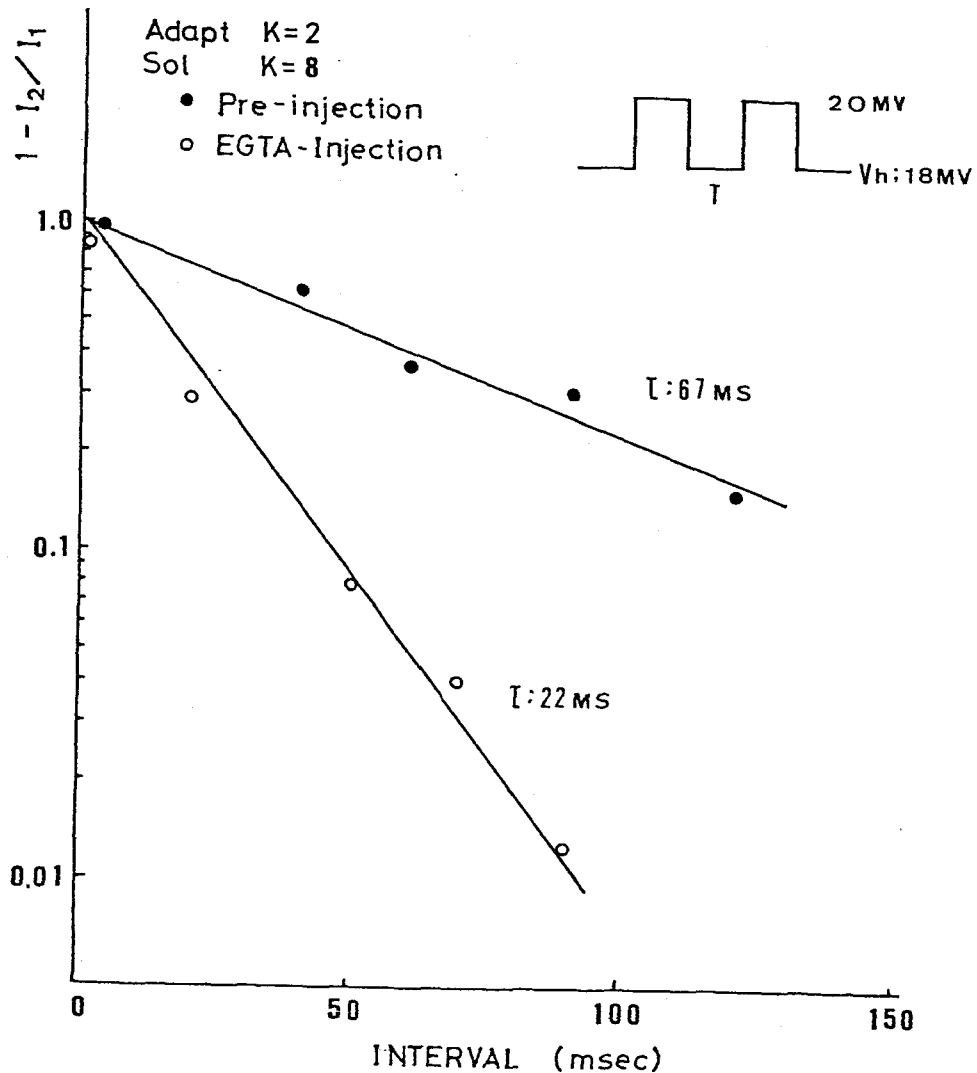


Fig 34 EGTA 微小注射による Ca チャネルの不活性化の解除の時間経過への効果。

$[K^+]_{\text{adapt}} = 2 \text{ mM}$, $[K^+]_o = 8 \text{ mM}$ の細胞に EGTA を微小注射をす前 (●) と後 (○) で Ca チャネルの不活性化の回復の測定グラフの縦軸, 横軸は, Fig 31 と同じ。

2-b-4 Kチャンネルによる Ca^{++} 電流の調節

次に Kチャンネルによる Ca^{++} 電流の調節の可能性を検討するために、膜電位固定下で脱分極性 step pulse に train pulse を重畳させた時の Ca^{++} 電流と K^+ の外向電流の時間変化を測定した。(Fig 35)

その結果(図)にみられる様に step pulse を与えた前の control の値と比べ step pulse を与えた後の外向 K^+ 電流は、いったん活性化され、その後約 10 秒程で不活性化していくのが観察された。反対に Ca^{++} 内向電流は、いったん不活性化されたのが徐々に再び解除されていくのがわかる。このような train pulse での Ca^{++} 電流 K^+ 電流の時間変化は Fig 35-A 図により明瞭に観察された。この K^+ 電流と Ca^{++} 電流の変化の時間経過は、ちょうど鏡像的である。これは、 K^+ 電流の活性化が Ca^{++} 電流の抑制をひき起こしていることを示唆している。すなわち、脱分極により活性化された外向 K^+ 電流が内向 Ca^{++} 電流を全体としてひき上げるために Ca^{++} 電流が減少している様に観察されている。

このような K^+ 電流の時間変化がどの様に起っているかをさらに詳しく解析するために興奮性 Ca チャンネルの欠損株である *cnr-A* 突然変異株を用いて実験を行った。*cnr-A* は Fig 36 に示す様に膜電位固定下で脱分極電位 pulse で Ca^{++} の内向電流が全く観察されず、泳ぎの方向転換、後退遊泳を全く示さないのが、電位依存性の K^+ 電流のみを単独に観察することが出来る。

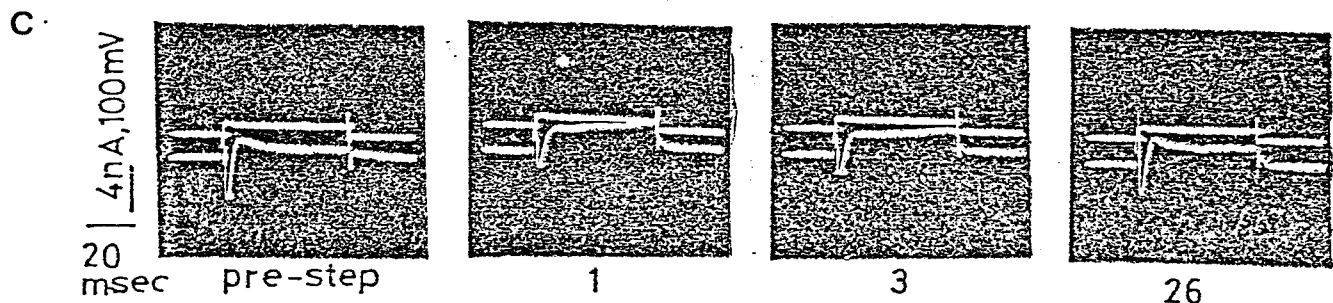
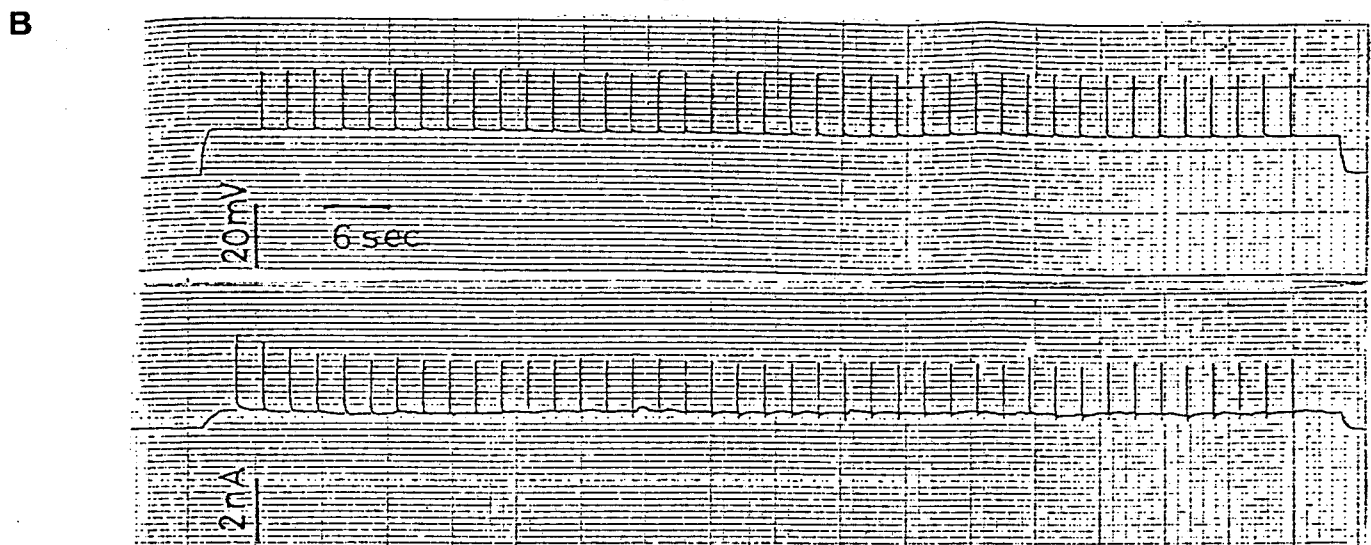
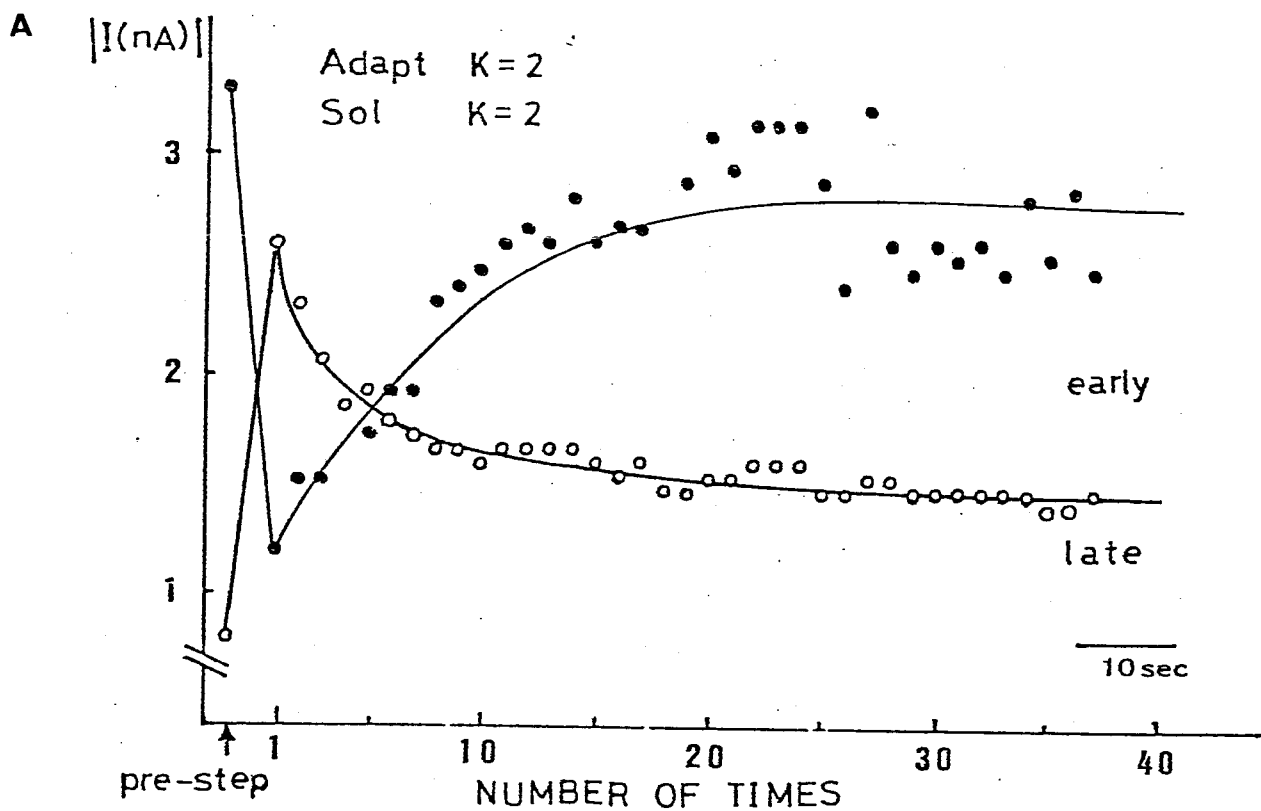


Fig 35 脱分極性ステ、 7° pulse と Train pulse を重畳させた時の Ca^{++} 内向電流と K^+ 外向電流の時間変化。

静上電位に膜電位固定し、 $14mV$ の脱分極ステ、 7° と与え、さらに $50msec$ の持続時間の $20mV$ 脱分極 train pulse を 3.3 秒間隔に重畳させた。

A: early: 内向 Ca 電流の絶対値 (\bullet) late: 外向 K^+ 電流の大きさ (\circ)
横軸は train pulse の回数

B: 上) 電位記録 下) 電流記録

C: 電流 (F) - 電圧 (上) 波形 数字は train pulse の回数 $[K^+]_{adapt} = 2mM$
 $[K^+]_o = 2mM$

この *cnr-A* 株を用いて、膜電位固定下で 16 mV の脱分極 *step pulse* を与え、さらに 23 mV の脱分極 *train pulse* を重畳させ、その時の膜電流応答を調べた (Fig 37)

その結果、脱分極により、電位依存性外内 K^+ 電流が急激に活性化され、*train pulse* の回数が重ねられるにつれ、徐々に不活性化されていくことがわかる (Fig 37-B)

この変化は、電流のチャートから見えることができる (Fig 37-A)

又、脱分極 *step* を与えることにより、 K^+ 電流の立ち上り時間が非常に短くなっている。Wild type の場合、

Ca^{2+} 内向電流は、脱分極 *pulse* を与えられて約 3 msec でピークに達するが、*cnr-A* の実験から 3 msec の時点ですでに、電位依存性の K^+ 電流の活性化が起っていることがわかる。この事は、一過性 Ca^{2+} 内向電流が電位依存性 K^+ 電流の立ち上り速度の変化により、

その大きさが調節されている可能性を示唆している。

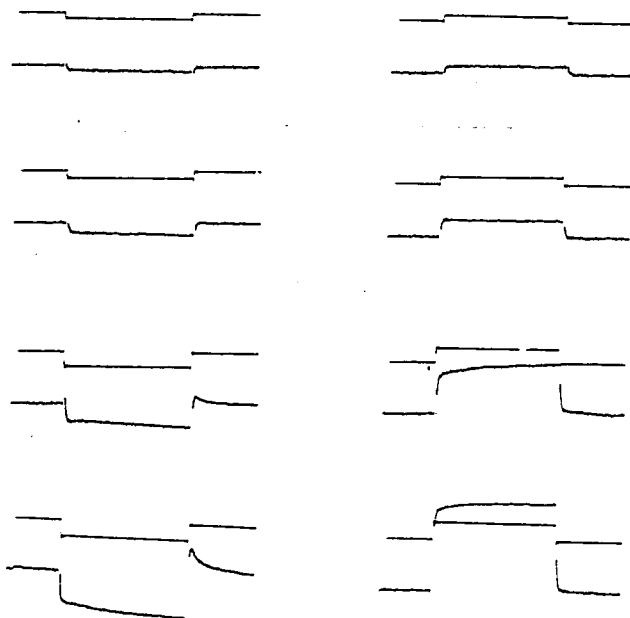


Fig 36

cnr-A の膜電位固定法による電流-電圧波形。細胞内 $[\text{K}^+] = 8\text{ mM}$ に適応させ、 $[\text{K}^+] = 8\text{ mM}$ で測定している。

4 nA, 100 mV

20 ms

このことは、Ca spike 発生の際その持続時間が電位依存性 K⁺電流によって調節されていると推定されることを意味している。

このような関係をさらに定量的に調べるために I-V 曲線で比較した。(Fig 38) Wild type の場合 Ca⁺⁺

cnr(16A326)

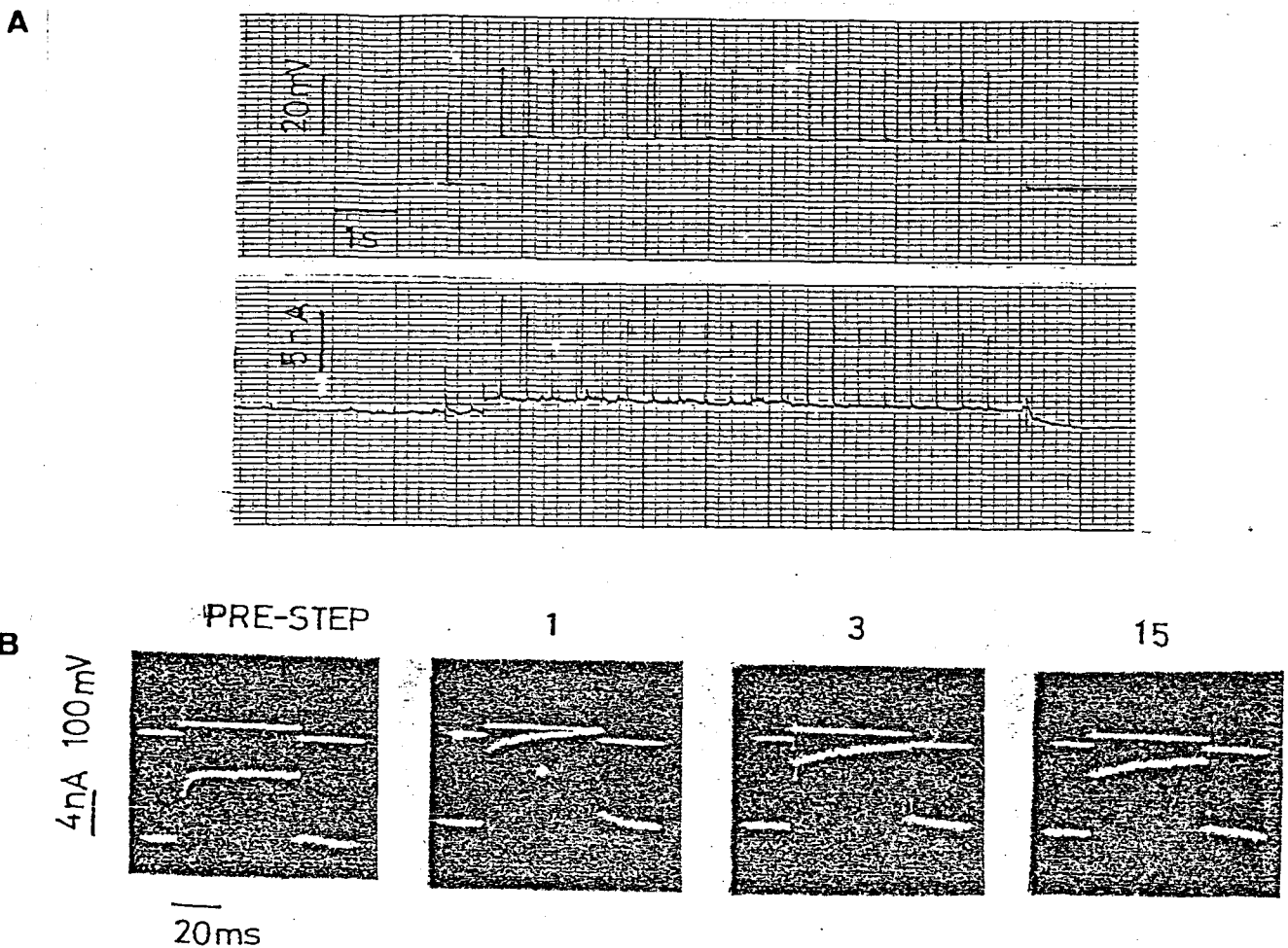


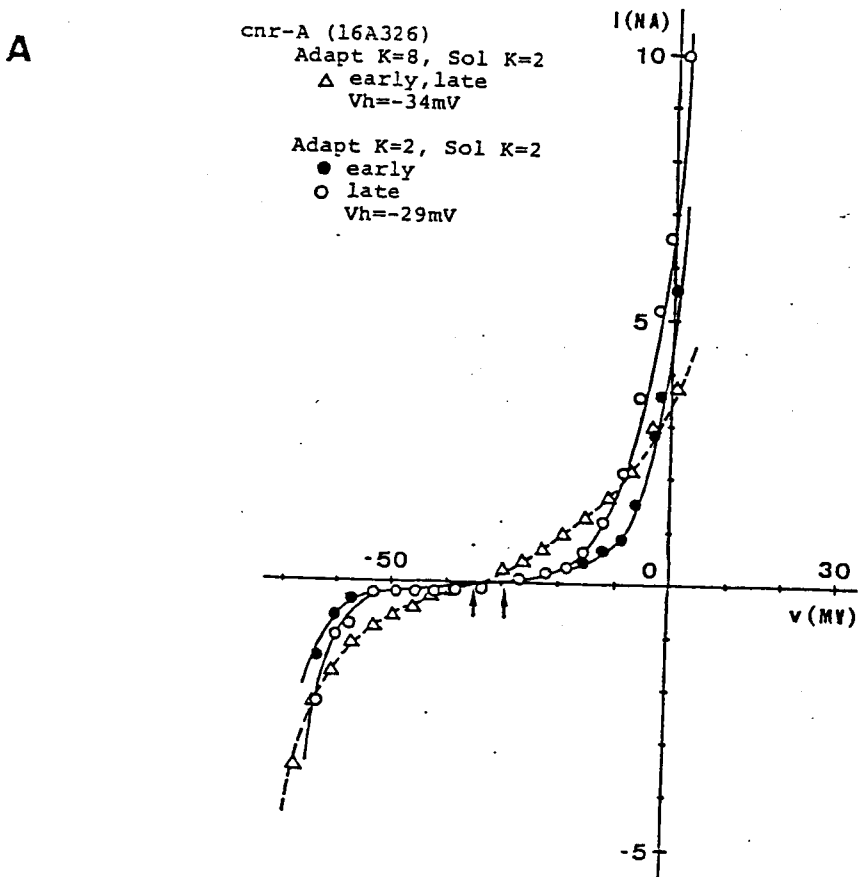
Fig 37 cnr-A の step pulse と train pulse の重畳による K⁺電流の変化

静止電位に膜電位固定し、16mV の脱分極 step pulse を与え、

さらに 23mV の train pulse を 3.3 秒間隔に重畳した。

A) 上: 電位記録, 下: 電流記録

B) 電流 (F) - 電圧 (上) 波形, 数字は train pulse の回数



B cnr-A

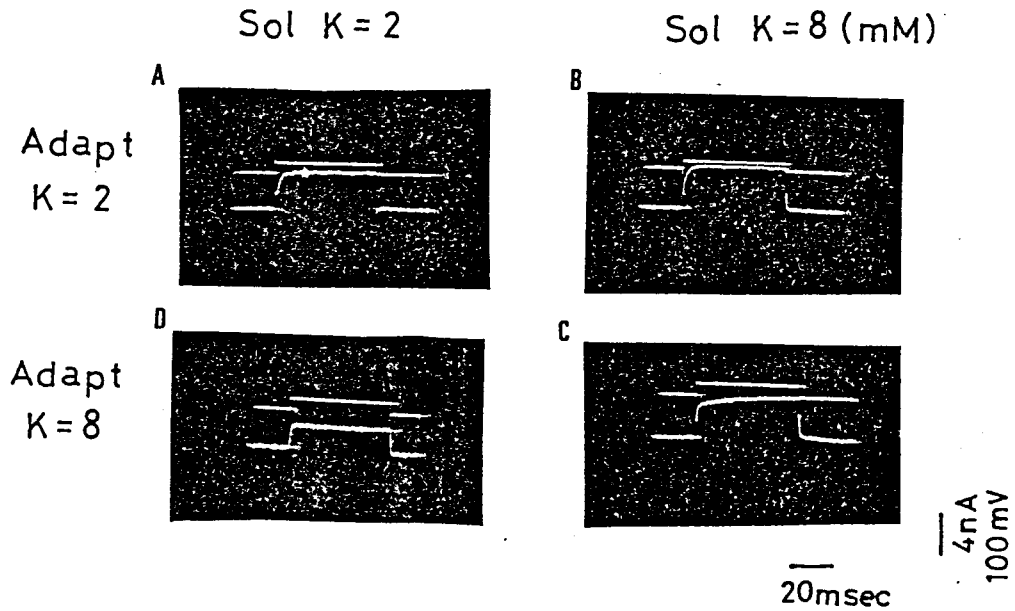


Fig 38 cnr-A の外向K⁺電流の立ち上り速度の変化

A; cnr-A の instantaneous I-V 曲線

late は 50 msec pulse の最後の時点の値 (●)

early は pulse 入力後 3 msec の時点の値 (○)

[K⁺] = 8 mM に適応した細胞の場合 late, early の差が大きい (Δ)

B; 適応 [K⁺] 濃度、測定 [K⁺] 濃度を変えた際の電流・電圧波形

内向電流は約3 msecで peak に達する。

そこで実験ではこの3 msecの時点での外向 K^+ 電流の大きさを比較した。その結果明らかに $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞の立ち上りは早く、 20 mV 脱分極時と比較すると $[K^+] = 2 \text{ mM}$ 適応の細胞に比べ、約1~1.5 nA 外向電流が大きかった。

2-C K耐性変異株の興奮性と K^+ イオン耐性

K^+ イオン耐性株は、wild typeが 20 mM 以上の K^+ 濃度の溶液中では生存が不可能であるのに対し、その溶液中でも生存可能な変異株である。この変異株は、“適応しない変異株”ではないかという報告 (Shusterman et al. 1978, Hansma 1981) があり、この形質と興奮性あるいは K^+ 耐性との相互関係を調べ、これらでみた Ca^{2+} チャネルの活性の調節による適応という考え方の検証を行う目的で実験を行った。

まず“Baダンス”と呼ばれる Ba^{2+} 溶液中($BaCl_2$ 8 mM , $CaCl_2$ 1 mM , Tris·HCl pH 7.2 1 mM)で、前進後退を急速にくり返す行動を指標に、 K^+ 耐性株の興奮性を調べた。この行動をしている時、膜は、脱分極性 Ca^{2+} スパイクを連続的に発生し、興奮をくり返している。wild typeの場合、 $[K^+] = 16 \text{ mM}$ の溶液($Ca^{2+} : 0.25 \text{ mM}$, Tris·HCl pH 7.2 1 mM)につけておくと、Baダンスをする能力を徐々に失っていく。それに対し K^+ 耐性株はこの溶液中で3日以上Baダンスをする能力を維持している。

K115

Adapt
 K=2 Ca=0.25
 Solution
 Ca=0.25
 ○ K=2
 Vh=-34mV
 ● K=8
 Vh=-30mV

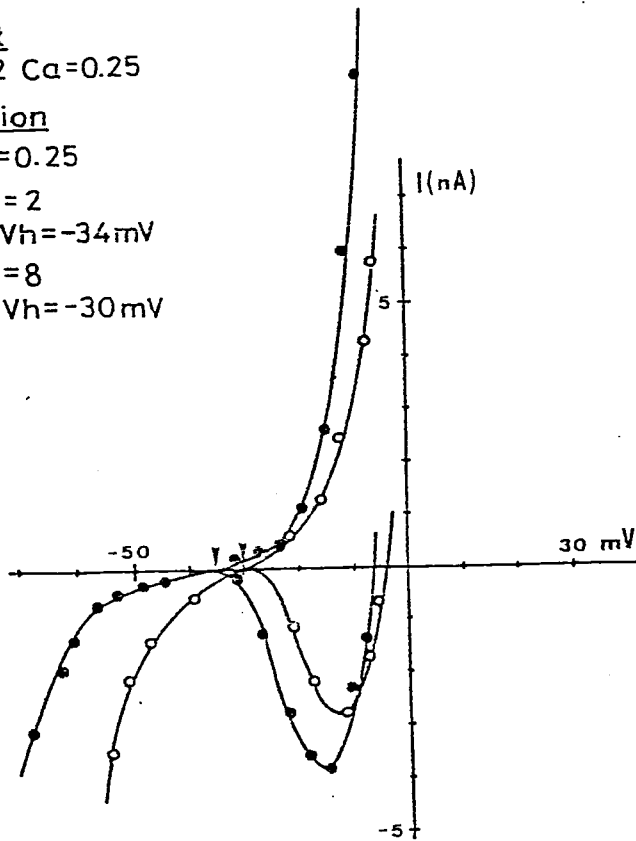


Fig 39

K耐性株のI-V曲線の $[K^+]_o$ 依存性
 $[K^+]_o=2mM$ に適応した細胞を $[K^+]_o=2mM$
 $[K^+]_o=8mM$ の各溶液中で静止電位に
 膜電位固定し、I-V曲線を得た。

さらに K^+ 刺激による
 方法で、K耐性株の
 興奮性を調べると。

$[K^+]_o=2mM$ に適応

した細胞は、 115.8 ± 22.7

秒、 $[K^+]_o=8mM$ に適応

したものは、 84.3 ± 23.0

秒の後退遊泳時間

となり、適応により変化

していることがわかる。

次にこの変異株
 の膜の性質を電気
 生理学的に調べた。

まず静止電位の外液
 K^+ 濃度依存性を調べ
 ると、K耐性株

は Wild type と比べ
 静止電位が外液 K^+
 濃度により依存し

ないことがわかる。

(Table IV)又膜電位固定下でI-V曲線の外液 K^+ 濃度依
 存性を調べると膜電位が K^+ 濃度により依存しない
 のに対応して Ca^{++} 内向電流も $[K^+]_o=8mM$ でも Wild type ほど
 抑制されないことがわかった。(Fig 39) この事から $[K^+]_o=8mM$
 の溶液中でも十分な興奮性を維持している原因と考え
 られる。

次に定常状態の Ca チャネルの不活性化の電位依存性を調べ
 た。(Fig 40)するとK耐性株の不活性化定数 h_{∞} の電位依存

性は、野生株のものと大差がないことがわかった。
すなわち、 K^+ 耐性株は静止電位の K^+ 濃度依存性が低いため、高い K^+ 溶液中でも定常状態の不活性化があまりかからない。そのため、高い K^+ 溶液中でも充分 Ca チャネルの活性化がおこり『Ba ガンス』を誘うことができることを示している。

TABLE IV. さまざまな K^+ 濃度溶液中での膜電位 (mV)

STRAIN \ [K ⁺]	2	4	8	16 (mM)
WILD (G-3)	-35.2	-29.5	-14.3	--
K-RESISTANT (K115)	-33.7	-30.6	-31.6	-17.2

[Ca²⁺]; 0.25 mM

Adapt ; [K] 2 mM

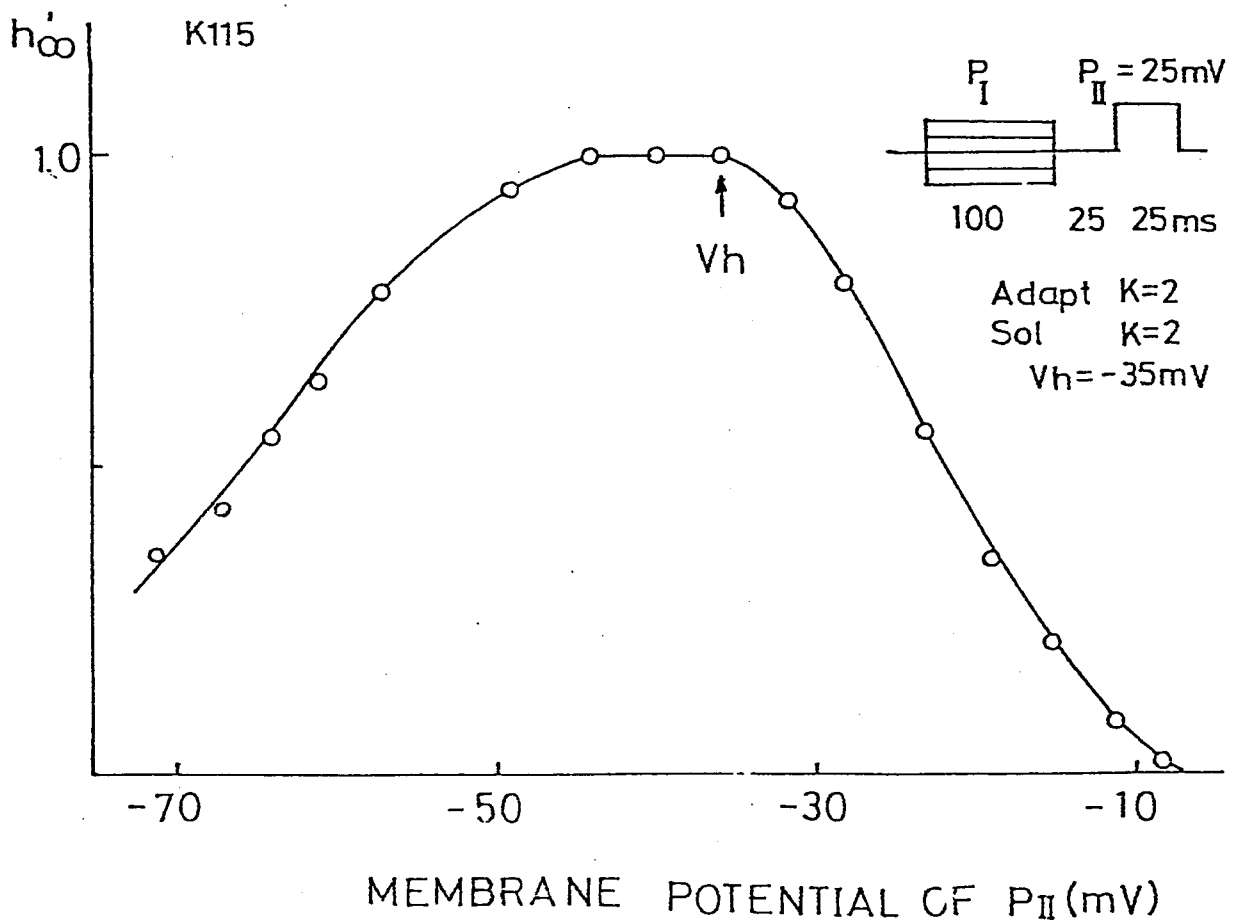


Fig 40 K^+ 耐性株の Ca チャンネルの不活性化の電位依存性
 $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に適応した細胞をその溶液中で測定した
 縦軸、横軸の意味は Fig 29 と同じ

§3. 考 察

これまで得られた結果から行動上で観察されたイオン適応にともなう膜の興奮性の変化のメカニズムについて考察を行なう。

まず膜電位固定下で測定された $I-V$ 曲線から適応 K^+ 濃度と外液 K^+ 濃度によつて Ca^{++} の内向電流の大きさが変化することが示された。 $[K^+] = 2mM$ の液に適応した細胞を適応濃度より高い K^+ 濃度で測定すると Ca^{++} の内向電流が小さくなるのは Fig 29 に示された Ca チャンネルの不活性化によるものと理解される。又、その不活性化は、Fig 28 の固定膜電位を脱分極させることにより再現できることから、電位依存性の不活性化によるものと考えられる。

EGTA 微小注射の実験に於いて、この条件の細胞の Ca^{++} の内向電流が EGTA によつて Ca^{++} をキレートしてもほとんど変化しないことから電位依存性の Ca チャンネルの不活性化が主に働いていると理解される。すなわち、外液 K^+ 濃度を上昇させると静止電位は、脱分極する。そのため主に電位依存性 Ca チャンネルの不活性化が起っている。この状態で EGTA を注入しても $I-V$ 曲線に変化が見られない。また、不活性化のかかっている残りのチャンネルを脱分極パルスで活性化させる時は、全く Ca^{++} 依存性がない。

次に興奮性 K チャンネルによる Ca^{++} 電流の調節の可能性について考察を行なう。まず Fig 35 の Train pulse の実験において、内向 Ca^{++} 電流と外向

K^+ 電流が鏡像的に変化する事実は、この可能性を示唆している。さらに、興奮性 Ca チャネルの欠損株である $cnr-A$ を用いた実験で電位依存性 K チャネルの活性化の時定数が適応にとまらぬ $0.5 \sim 4 \text{ msec}$ の間で変化していることが示された。興奮性 Ca チャネルの内向電流の C_{∞} が約 3 msec である事を考えると明らかにこの K 電流の影響を受けるとことになる。この事は、Fig 29 の Ca チャネルの不活性化曲線と Fig 38 の $cnr-A$ の $I-V$ 曲線を比較するとさらに明瞭になる。すなわち Fig 29 の第2 test pulse の値である $+20 \text{ mV}$ で Fig 38 の $I-V$ 曲線での early の電流値を比較すると、2つの適応条件の間で約 1.5 nA の差が出る事がわかる。この値は、Fig 29 の実験で $h_{\infty} = 1$ の値から 5.5 nA に相当するたため、 h_{∞}' に換算すると約 0.27 となり、 $[K^+]_{\text{adapt}} = 8 \text{ mM}$, $[K^+]_0 = 8 \text{ mM}$ の細胞と、 $[K^+]_{\text{adapt}} = 2 \text{ mM}$, $[K^+]_0 = 2 \text{ mM}$ の細胞の不活性化曲線の上下方向の大きさのずれに相当する。したがって、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ に適応した細胞から $[K^+] = 2 \text{ mM}$ に移す時、その液に適応していく過程は、電位依存性 K チャネルの活性化の時間が約 4 msec から 0.5 msec に速くなる過程と考えられる。即ち、 $[K^+] = 8 \text{ mM}$ 適応型の場合 K^+ 刺激の際、 K^+ チャネルの活性化の速さがはやいため、 Ca スパイクが早く減衰する。一方で $[K^+] = 2 \text{ mM}$ 適応型の場合、 K チャネルの活性化の速さがおそくなるので Ca スパイクの持続時間が長くなるものと考えられる。

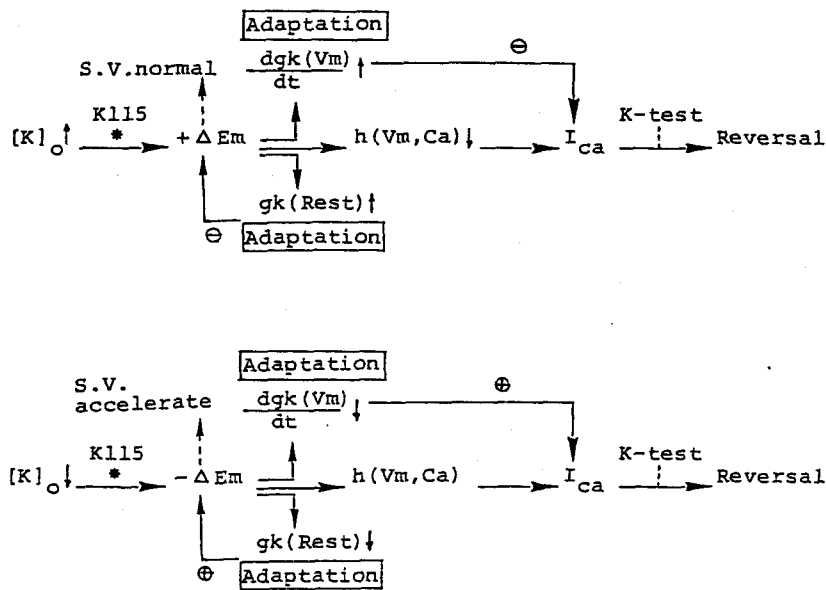


Fig 41 ソウリムシのイオン環境適応にともなう行動の変化を説明する模式図

Table V イオン環境適応に伴う Ca 及び K チャネルの活性化あるいは不活性化の時間定数

TIME	Ca channel	$g_{K}(Rest)$	$g_{K}(Vm)$
1msec	<u>Activate</u> $T_m \sim 1.5msec$		0.5msec $[K]_o$ high Adapt.
	<u>Inactivate</u> $Th_1(Ca) = 2msec$		\downarrow Activate T_m 4msec $[K]_o$ low Adapt.
10msec			
100msec	<u>Recovery from inactiv.</u> $T \sim 70msec$		
1 sec	<u>Inactivate</u> $Th_2(Vm) \sim 250msec$		
1 hour			<u>Adaptation E_m</u> 1~3 hour

結論として、イオン環境適応にともなう興奮性の変化は、静止電位の変化による電位依存性 Ca チャンネルの不活性化と K チャンネルの活性化のほやほやの変化による Ca^{2+} 電流の調節により起こると言える。

一方 K 耐性株の高い K^+ 濃度環境での興奮性維持の機構も、これと同様の考えから説明される。すなわち、 K 耐性株は静止電位の K^+ 濃度依存性が小さく高い K^+ 濃度下でもあまり脱分極しない。そのため Ca チャンネルの不活性化過程があまり起こらず、そのような環境下でも興奮性を維持できる。

イオン環境適応に伴って変化するものの実体は、一つは、静止電位を決定している K コンダクタンスであり、それは、適応に伴い、1時間から3時間で変化する、さらに一つは、電位依存性 K コンダクタンスであり、その活性化時間常数は $0.5 \mu\text{sec}$ から $4 \mu\text{sec}$ の間で変化する。この2つの K チャンネルの変化が興奮性あるいはシグナルを調節しているものと考えられる。

第六章 結び

ゾウリムシの泳ぎの変化は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によって引き起こされる。ゾウリムシが環境に適応し、平常の泳ぎを保つためには、細胞内 Ca^{2+} 濃度が低いレベルに保たれる必要がある。

そのためには、第三章でみたように静止電位を決定する、 K^{+} チャンネルの性質と第五章でみたように電位依存性の K^{+} チャンネルの性質とが適応にともない変化し、細胞内への Ca^{2+} 流入量を調節することが示された。適応にともなって変化するから K^{+} チャンネルの物質的な基礎は何であるのか、現在のところ不明である。

しかし、その可能性として、Fig 42 に示したように代謝経路の変化、膜流動性の変化、あるいはチャンネルのリン酸化による変化等について今後検討を加えることが必要とされる。

このような課題に対して、電気生理学的な手段を用いた興奮性膜の研究が、膜脂質調節系、細胞骨格調節系等に関する生化学的あるいは細胞生物学的研究と協同して進められることが、今後よりいっそう重要になってくると思われる。

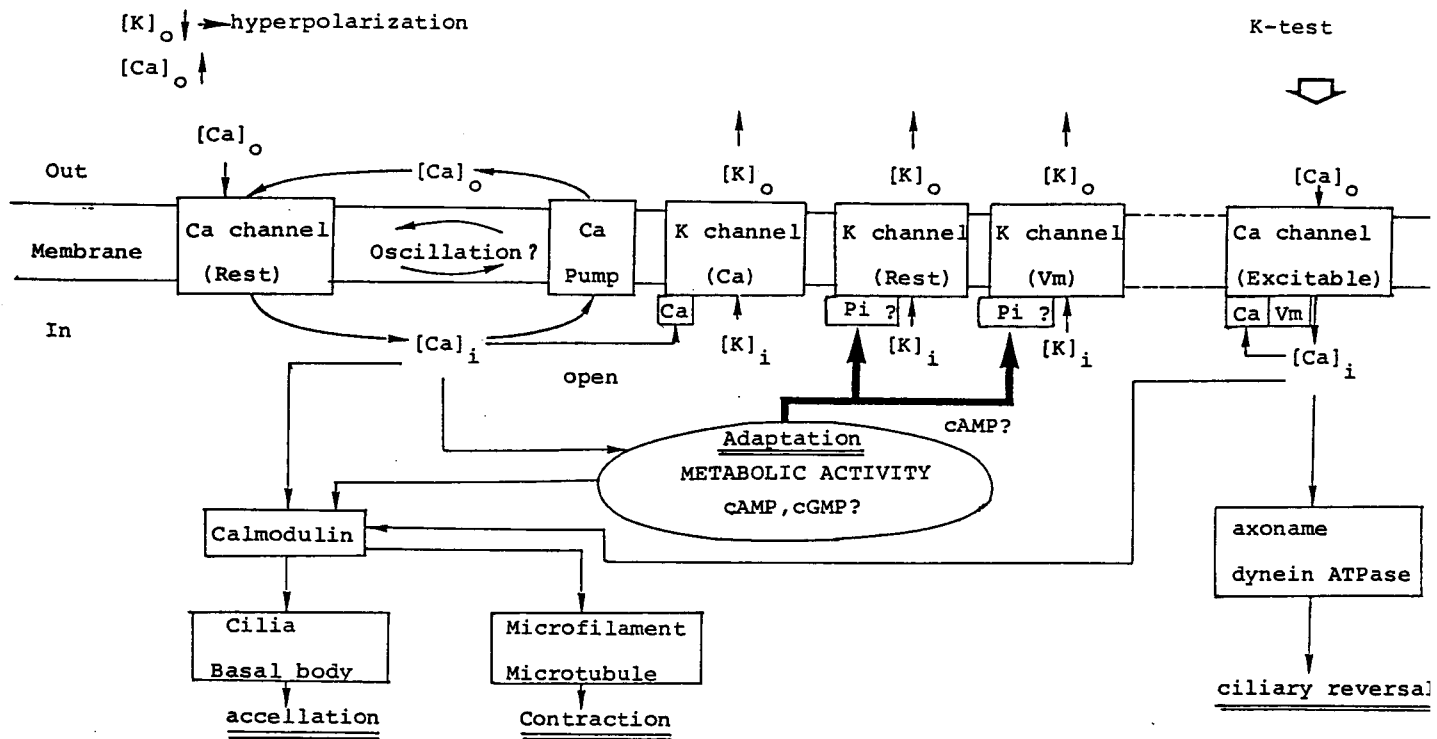


Fig 42 ソウリムシのイオン環境適応機構に関する模式図

謝 辞

本研究を行なうに当たり終始適切な助言と示唆を与え指導して下さいました大沢文夫教授に深く感謝いたします。又協同研究者として常に有意義な議論と指導をしていただきました中岡保夫博士に心から感謝致します。東北大学の樋渡宏一教授、筑波大学の高橋三保子助教授からは、Cnr-A, K-resistant 等のゾウリムシの突然変異株を快く提供して頂いた事をお礼申し上げます。

葛西道生教授をはじめ大沢研究室のスタッフ及び大学院生の方々には有益な議論や実験上で便宜をはかって頂きました。心から感謝いたします。

最後に、本論文の清書に際し、大変お世話になりました大井英之氏に感謝いたします。

引用文献

- Akaike N. Lee K. & Brown A.M. (1978)
The calcium current of *Helix* neuron.
J. Gen. Physiol. 71, 509-531
- Brehm P. & Eckert R. (1978)
An electrophysiological study of the regulation of ciliary
beating frequency in *Paramecium*.
J. Physiol. 283, 557-568
- Brehm P. & Eckert R. (1978)
Calcium entry leads to inactivation of calcium channel
in *Paramecium*. *Science N.Y.* 202, 1203-1206
- Brehm P., Eckert R. & Tillotson D. (1980)
Calcium-mediated inactivation of calcium current in
Paramecium. *J. Physiol.* 306, 193-203
- Castellucci V.F. et al. (1980)
Intracellular injection of catalytic subunit of cyclic
AMP-dependent protein kinase simulates facilitation of
transmitter release underlying behavioral sensitization
in *Aplysia*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 77, 7492
- Dunlap K. (1977)
Localization of calcium channels in *Paramecium caudatum*.
J. Physiol. 271, 119-133
- Eckert R. (1972)
Bioelectric control of ciliary activity.
Science N.Y. 176, 473-481
- Eckert R. & Naitoh Y. (1972)
Bioelectric control of locomotion in the ciliate.
J. Protozool. 19(2), 273-243
- Eckert R. & Machemer H. (1975)
Regulation of ciliary beating frequency by the surface
membrane. in "Molecules and cell movement" edited by
Inoue S. et al. Raven Press New York
- Eckert R. Naitoh Y. & Machemer H. (1976)
Calcium in the bioelectric and motor functions of
Paramecium. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 30, 233-255
- Eckert R. & Brehm P. (1979)
Ionic mechanisms of excitation in *Paramecium*.
Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 8, 353-383
- Fortner H. (1925)
Über die Gesetzmäßigkeit der Wirkungen des osmotischen Druckes
physiologisch indifferenten Lösungen auf einzellige, tierische
Organismen. *Biol. Zbl.* 45, 417-446
- Hirata F. & Axelrod J. (1980)
Phospholipid methylation and biological signal transmission.
Science 209, 1082-1090

- Houten J.V.(1978)
Two mechanisms of chemotaxis in Paramecium.
J.Comp.Physiol.127,167
- Houten J.V.(1979)
Membrane potential changes during chemokinesis in Paramecium.
Science 204,1100
- Houten J.V. et al.(1982)
Kinetic analysis of chemokinesis of Paramecium.
J.Protozool.29, (2), 226
- Henessey T. & Nelson D.L.(1979)
Thermosensory behavior in paramecium tetraurelia;A quantitative assay and some factors that influence thermal avoidance.
J.Gen.Microbiol.112,337
- Hochachka P.W. & Somero G.N.(1973)
Strategies of biochemical adaptation .
W.B.Sanders Company ,Philadelphia.
- Hochachka P.W. & Somero G.N.(1976) 藤田道也訳
「環境適応の生化学 — その分子論理」 共立出版
- Hildebrand E. & Dryl S.(1976)
Significance of Ca and K ions for the excitation of protozoan membrane. Bioelectrochem.Bioeng.3,543-544
- Hildebrand E.(1978)
Ciliary reversal in Paramecium;Temperature dependence of K-induced excitability decrease and of recovery.
J.Comp.Physiol.127,39-44
- Hansma H.G.(1981)
Evidence for a Ca-channel mutation in the K-resistant mutants of Paramecium.
J.Memb.Biol. 60,257-264
- Hodgkin A.L. & Huxley A.F.(1952b)
A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.
J.Physiol.(Lond.)117,500
- Hodgkin A.L. & Huxley A.F.(1952a)
The dual effect of membrane potential on sodium conductance in the giant axon of Loligo.
J.Physiol.(Lond.)116,497
- 伊藤真次 (1974)
「適応のしくみ — 寒さの生理学 —」 北大出版会
- Jahn T.L.(1961)
The mechanism of ciliary movement I.Ciliary reversal and activation by electric current;the Ludloff phenomenon in terms of core and volume conductors.
J.Protozool.8,369

- Jahn T.L.(1962)
The mechanism of ciliary movement II. Ciliary reversal and ion antagonism.
J.Cellular comp.Physiol.60,217
- Jennings H.S.(1906)
"Behavior of lower organisms" Columbia Press
- Kort E.N.Goy M.F.,Larsen S.H.& Adler J.(1975)
Methylation of a protein involved in bacterial chemotaxis.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 72,3939-43
- Klein M.& Kandel E.R.(1980)
Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 77,6912
- Kamada T.& Kinoshita H.(1940)
Calcium-potassium factor in ciliary reversal of Paramecium.
Proc.Imp.Acad.Tkyo 16,125
- Kinoshita H.(1954)
Electric potentials and ciliary responses in Opalina.
J.Fac.Sci.Imp.Univ.Tkyo 7,1-14
- Kishimoto U.(1972)
Characteristics of the excitable chara membrane.
Advan.in Biophys. 3,199-226
- Matsumoto G.& Sakai H.(1979a)
Microtubules inside the plasma membrane of squid giant axons and their possible physiological function.
J.Membrane Biol.50,1-14
- Matsumoto G. & Sakai H.(1979b)
Restoration of membrane excitability of squid giant axons by reagents activating tyrosine-tubulin ligase.
J.Membrane Biol. 50,15-22
- Machemer H. & Eckert R.(1973)
Electrophysiological control of reversed ciliary beating in Paramecium. J.Gen.Physiol.61,572-587
- Machemer H.(1974)
Frequency and directional responses of cilia to membrane potential changes in Paramecium.
J.Comp.Physiol.92,293-316
- Machemer H.& Eckert R.(1975)
Ciliary frequency and orientational responses to clamped voltage steps in Paramecium.
J.Comp.Physiol.104,247-260
- Machemer H.(1976)
Interactions of membrane potential and cations in regulation of ciliary activity in Paramecium.
J.Exp.Biol.65,427-448

- Michell R.H.(1975)
Inositol phospholipids and cell surface receptor function.
B.B.A.415,81-147
- Meech R.W.& Standen N.B.(1975)
Potassium activation in Helix aspersa neurons under voltage clamp; A component mediated by calcium influx.
J.Physiol.249,211-239
- 中岡保夫, 大沢文夫 (1978)
「単細胞生物の環境への慣れ」 神経研究の進歩 22 (5), 951
- Nozawa Y. & Kasai R.(1978)
Mechanism of thermal adaptation of membrane lipids in Tetrahymena pyriformis NT-1; Possible evidence for temperature-mediated induction of Palmitoyl-CoA disaturase.
B.B.A.529,54-66
- Naitoh Y.(1968)
Ionic control of the reversal response of cilia in Paramecium caudatum ; A calcium hypothesis.
J.Gen.Physiol.51,85-103
- Naitoh Y. & Eckert R.(1968)
Electrical properties of Paramecium caudatum ; modification by bound and free cations.
Z.Vergl.Physiol.61,427-452
- Naitoh Y. & Eckert R.(1969)
Ionic mechanisms controlling behavioral responses in Paramecium to mechanical stimulation.
Science 164,963-5
- Naitoh Y. , Eckert R. & Friedman K.(1972)
A regenerative calcium responses in Paramecium.
J.Exp.Biol.56,667-681
- Naitoh Y. & Eckert R.
Electrophysiology of ciliate protozoa.
Exp.Physiol.Biochem.5,17
- Naitoh Y. & Kaneko H.(1972)
Reactivated triton-extracted model of Paramecium; modification of ciliary movement by calcium ions.
Science 176,523-4
- Naitoh Y. & Kaneko H.(1973)
Control of ciliary activities by adenosinetriphosphate and divalent cations in Triton-extracted models of Paramecium caudatum. J.Exp.Biol.58,657-676
- Ogura A. & Machemer H.(1980)
Distribution of mechanoreceptor channels in the Paramecium surface membrane. J.Comp.Physiol.135,233

- Okada Y. et al.(1979)
Oscillations of membrane potential in L cells.IV.
Role of intracellular Ca^{++} in hyperpolarizing excitability.
J.Memb.Biol.47,357-376
- Okada Y. et al.(1981)
Role of calmodulin-dependent Ca^{++} -pump and K^+ channel in
oscillation of membrane potential in L-strain fibroblast.
J.Physiol.318,40
- Okada Y.,Tsuchiya W.& Yada T.(1982)
Calcium channel and calcium pump involve in oscillatory
hyperpolarizing responses of L-strain mouse fibroblast.
J.Physiol.327,449-461
- Oertel D.,Schein S.& Kung C.(1977)
Separation of membrane currents using a Paramecium mutant.
Nature(London) 268,120-124
- Oertel D,Schein S.J.& Kung C.(1978)
A potassium conductance activated by hyperpolarization in
Paramecium. J.Membrane Biol.43,169-185
- Parkinson D.(1977)
Behavioral genetics in bacteria.
Ann.Rev.Genet,11,397-414
- Plant T.D. & Standen N.B.(1981)
Calcium dependent inactivation in identified neurons
of Helix aspersa. J.Physiol.321,273-285
- Springer M.S.,Goy M.F. & Adler J.(1977)
Sensory transduction in Escherichia coli ;two complementary
pathways of information processing that involve methylated
proteins. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 74,3312-16
- Sinensky M.(1974)
Homeoviscous adaptation - A homeostatic process that regulates
the viscosity of membrane lipids in Escherichia coli.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71,522
- Shusterman C.L.Thiede E.W. & Kung C.(1978)
 K^+ -resistant mutants and "adaptation" in Paramecium.
Proc.Nat.Acad.Sci.USA 75(11),5645-5649
- Satow Y. & Kung C.(1980)
 Ca^{++} -induced K^+ -outward current in Paramecium tetraurelia.
J.Exp.Biol.88,293-303
- Toyotama H. & Nakaoka Y.(1979)
Effect of temperature on the swimming velocity of Triton-
extracted models of Paramecium Caudatum.
Cell Structure and Function 4,35-43
- Tanaka H.(1982)

Tillotson D. & Horn R. (1978)
Inactivation without facilitation of Ca conductance in
caesium-loaded neurons of Aplysia.
Nature 273, 512

Tillotson D. (1979)
Inactivation of calcium conductance depends on entry
of Ca ions in molluscan neurons.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 76, 1497

内田清一郎, 菅原浩 (1977)

「適応の生物学」 講談社サイエンスフィク

Wilson W.A. & Wachtel H. (1974)
Negative resistance characteristic essential for the
maintenance of slow oscillations in bursting neurons.
Science 186, 932-934