

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 1 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650032

研究課題名(和文)人工膜を用いた膜電位理論の検証

研究課題名(英文) Investigation of validity of membrane theory

研究代表者

玉川 浩久 (Tamagawa, Hirohisa)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：60324282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：膜電位の振る舞いを説明する概念にDonnan理論とGoldman-Hodgkin-Katzの式(GHKの式)があり、これらは定説となっている。これら定説によれば、イオンの細胞膜透過が膜電位発生に深く関わっている。しかし、定説では説明できない膜電位の振る舞いが報告されている。Ling博士が唱えた吸着理論によれば、膜電位発生は可動イオンが細胞構成物質に吸着固定化されることに起因し、イオンの細胞膜透過性とは一切関係が無い。本研究では、Donnan理論及びGHKの式の妥当性を再考した。そして、定説では実験事実を説明することは出来ず、Lingの吸着理論が膜電位発生のメカニズムである、という結論を得た。

研究成果の概要(英文)：The potential between two electrolytic solutions separated by a membrane impermeable to ions was measured and. From the physiological point of view, a nonzero membrane potential or action potential cannot be observed across the impermeable membrane. However, a nonzero membrane potential including action potential-like potential was clearly observed. Those observations gave rise to a doubt concerning the validity of currently accepted generation mechanism of membrane potential and action potential of cell. As an alternative theory, we found that the long-forgotten Ling's adsorption theory was the most plausible theory. It suggests that the membrane potential and action potential of a living cell is due to the adsorption of mobile ions onto the adsorption site of cell. Consequently, it was found that Ling's adsorption theory was in full harmony with the experimental facts.

研究分野：電気化学 高分子材料工学

キーワード：膜電位 Goldman-Hodgkin-Katzの式 Donnan理論 吸着理論

1. 研究開始当初の背景

生命の構成単位である細胞には、膜電位と呼ばれる電位差が細胞膜を介して発生している。細胞静止期の膜電位は Donnan 理論、活動期の膜電位は Goldman-Hodgkin-Katz の式で説明され、これら理論が現在膜電位発生を説明する概念として定説となっている。いずれの理論においても可動イオンが細胞膜を最低一回は透過することが前提とされている。しかしながら、古くからこれら定説では説明できない現象が知られている。これら定説が果たして真に正しい学説であるかどうかを検証する必要があると考え、本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

細胞に発生する膜電位の振る舞いを説明する概念に Donnan 理論と Goldman-Hodgkin-Katz の式(GHK の式)がある。これら理論は大きな成功をおさめ、今日では定説となっている。これら定説に共通していることは、イオンの細胞膜透過が膜電位発生に深くかかわっているということである。Donnan 理論によれば、細胞内外のイオン濃度の非対称性が細胞静止期の膜電位発生の起源である。細胞内外のイオンの濃度の非対称性があるということは少なくともその非対称性を生み出すためにイオンが細胞膜を最低一度は透過する必要があるということである。細胞活動期の膜電位発生は GHK の式によれば細胞内外の各イオン濃度と各イオンの細胞膜透過性に支配されている。しかし、これら定説では説明できない膜電位の振る舞いが古くから報告されている。果たしてこれら定説は本当に正しいのであろうか。

Donnan 理論、GHK の式に代わる概念に G. Ling 博士が唱えた吸着理論がある。Ling の吸着理論によれば膜電位発生の起源は Donnan 理論、GHK の式、いずれでも説明されない。Ling の吸着理論によれば、膜電位は可動イオンが細胞構成物質に吸着固定化されることによって引き起こされるものであり、イオンの細胞膜透過性とは一切関係が無い。

本研究では、Donnan 理論及び GHK の式の妥当性を再考した。そして、結論として両理論とも実験事実を説明することは出来ず、Ling の吸着理論が膜電位発生のメカニズムである、という結論を得た。以下にその詳細を説明する。

3. 研究の方法

実際の細胞を使って Donnan 理論、GHK の式の正否及び Ling の吸着理論の妥当性を実験的に検証することは、実験を複雑化させ、明確な結果を得るには不適切と考え、それに代わる実験系を考案し実験を行った。

細胞とは単純にとらえれば半透性の細胞膜が細胞内外の水溶液を分け隔てたものである。これを本研究ではイオン性水溶液を入

工膜で分け隔てた系に置き換えて実験を行った。

3.1 実験装置

図1は本実験で用いた実験装置である。North、South、West、East、Centerの5つの水溶液槽が膜(N-C、S-C、W-C、E-C)で分け隔てられている。以後、North、South、West、East、CenterをそれぞれN槽、S槽、W槽、E槽、C槽と呼ぶ。図1中 voltmeter A はS槽を基準にしたN-S槽間電圧、voltmeter B はE槽を基準にしたW-E槽間電圧を計測する。

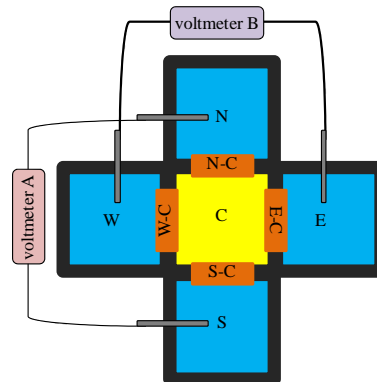


図1 膜電位測定装置

3.2 実験手順

【実験1】半透膜を介した膜電位計測

以下、Stepごとに実験手順を説明する。
 [Step 1] N-C、S-C、W-C、E-Cとして固定負電荷を持つ半透膜を用いる。
 [Step 2] N槽、S槽、W槽、E槽、C槽をそれぞれ0.001M、飽和、0.01M、飽和、1Mの濃度のKCl水溶液で満たす。
 [Step 3] N-S槽間電圧(P_{N-S})とW-E槽間電圧(P_{W-E})の経時変化測定を開始する。なお、 P_{i-j} とはj槽の電位を基準(0 mV)とした時のi槽の電位という意味である。
 [Step 4] 測定開始後10秒程度経過した後W槽のKCl水溶液を抜き取り(100%完璧に抜き取ることは出来ない)飽和KCl水溶液を注ぐ。この間電圧測は継続したままにする。
 [Step 5] Step 4のW槽KCl水溶液交換終了後1分程度経過したら槽間電圧計測を終了する。

【実験2】不透過液膜を介した膜電位計測

[Step 1] 図1の、N-C、S-C、W-C、E-Cを実験装置から外す。そして、C槽に固定電荷を末端に有する長鎖炭化水素分子を含む1-ペンタノール溶液を入れる。
 [Step 2] N槽、S槽、W槽、E槽、をそれぞれ0.00001M、飽和、1M、飽和の濃度のKCl水溶液で満たす。N-C、S-C、W-C、E-Cは存在しないので、N槽、S槽、W槽、E槽の4槽内のKCl水溶液は直接C槽の1-ペンタノール溶液と接している。

[Step 3] N-S 槽間電圧 (P_{N-S}) と W-E 槽間電圧 (P_{W-E}) の経時変化測定を開始する。
 [Step 4] Step 3 の槽間電圧経時変化測定を開始後 3 分程度経過したら計測を終了する。

4. 研究成果

【実験 1】半透膜を介した膜電位計測

本実験で重要な点は、以下の(i)と(ii)である。
 (i)GHK の式によれば、イオンの膜透過は非ゼロ膜電位発生に必要であり、膜電位の振る舞いに深く関わっている。
 (ii)[Step 4]において W 槽が KCl 水溶液交換により濃度擾乱を受ける。

本実験では P_{N-S} と P_{W-E} の経時変化測定を行うが、 P_{W-E} として非ゼロ電位が発生するならば、図 2 に太矢印で示すように、W 槽-E 槽間に C 槽を介してイオン流が生じたということである。図 3 は P_{N-S} と P_{W-E} の経時変化を示しているが、図 3 中矢印で示した時刻に W 槽の KCl 水溶液交換を行っているが、明らかに P_{W-E} の変化が生じている。つまり、このとき W 槽-C 槽-E 槽にイオン流変化が生じたということである。

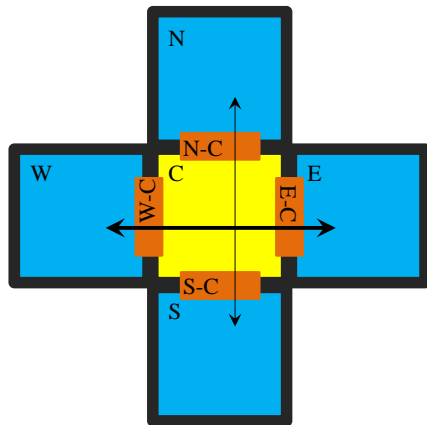


図 2 イオン流

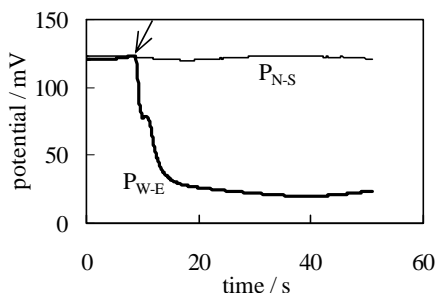


図 3 P_{N-S} と P_{W-E} の経時変化

本実験では同時に P_{N-S} の経時変化も計測しているが、 P_{N-S} に非ゼロ電位が生じるならば N 槽-S 槽間に C 槽を介してイオン流が生じたということである。図 3 より P_{N-S} は非ゼロであり、N 槽-C 槽-S 槽に図 2 の細矢印で示すようなイオン流が生じていることが示唆される。W 槽-E 槽間イオン流と N 槽-S 槽間イオン流は図 2 から明らかのように C 槽で衝

突する。つまり、[Step 4]で W 槽に引き起こされた KCl 濃度擾乱は W 槽-E 槽間イオン流の変化を引き起こし、この変化したイオン流が C 槽で N 槽-S 槽間イオン流に衝突することで、結果的に P_{W-E} のみならず P_{N-S} の変動も引き起こすはずである。しかしながら、図 3 に示す実験結果は P_{N-S} が終始一定に保たれることを示している。この結果は GHK の式では説明できない。Donnan 理論でこの現象は説明可能であろうか。Donnan 理論は平衡状態を扱う概念であり、イオン濃度変動があるような系に適用するのは不適切である。

【実験 2】不透過液膜を介した膜電位計測

本実験で重要な点は、C 槽の 1-ペンタノール溶液は、水と混和しないので、N 槽、S 槽、W 槽、E 槽の 4 槽内の KCl 水溶液を透過させない不透過膜と見なせる、ということである。

C 槽内の 1-ペンタノールに、末端に固定負電荷を持つ長鎖炭化水素分子を溶解させておいた場合の P_{N-S} と P_{W-E} の経時変化測定結果を図 4 に示す。 P_{N-S} と P_{W-E} はいずれも終始ほぼ一定に保たれ、 $P_{N-S} \sim 130$ mV、 $P_{W-E} \sim 0$ mV であった。

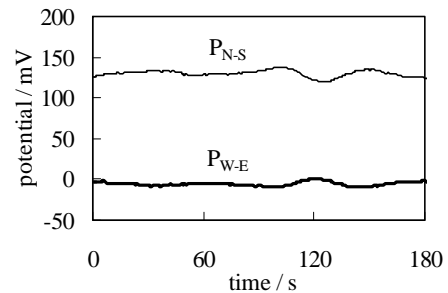


図 4 P_{N-S} と P_{W-E} の経時変化

P_{N-S} と P_{W-E} はいずれも不透過膜である C 槽を介した二つの KCl 水溶液間の電位差であり、イオンの膜透過を前提とする GHK の式でこの結果を説明することは出来ない。では Donnan 理論で説明可能か考えてみる。

まず、W 槽を基準にした N 槽の電位 (P_{N-W}) を考える。 P_{N-S} と P_{W-E} に関しては以下の二式が成り立つ。

$$P_{N-S} = P_{N-C} + P_{C-S}$$

$$P_{W-E} = P_{W-C} + P_{C-E}$$

C 槽はイオン不透過性であり、N 槽、S 槽、W 槽、E 槽の 4 槽内の KCl 濃度は最初から最後まで不変と考えられる。S 槽と E 槽の KCl 濃度は終始同じ飽和であることから $P_{C-S} = P_{C-E}$ であろう。したがって、以下の式が得られる。

$$P_{N-S} - P_{W-E} = P_{N-C} + P_{C-S} - (P_{W-C} + P_{C-E}) \\ = P_{N-C} - P_{W-C}$$

この式の右辺の $P_{N-C} - P_{W-C}$ は以下のように記

述できる。なお、すでに説明したが、ここで改めて説明しておく、 P_{i-j} とはj槽の電位を基準(0 mV)とした時のi槽の電位という意味である。

$$P_{N-C} - P_{W-C} = P_{N-C} + P_{C-W}$$

この式の右辺は明らかに P_{N-W} である。すなわち以下の式が得られる。

$$P_{N-W} = P_{N-S} - P_{W-E} \sim 130 \text{ mV} - 0 \text{ mV} \\ \sim 130 \text{ mV}$$

N槽の K^+ 濃度 $[K^+]_N$ とW槽の K^+ 濃度の比は、実験条件からすぐに、 $[K^+]_N/[K^+]_W = 0.00001M / 1M = 0.00001$ とわかる。では実験で得られた P_{N-W} の値を用いて Donnan 理論によって $[K^+]_N/[K^+]_W$ を理論的に求めてみるとどうなるであろうか。以下の式が Donnan 理論による $[K^+]_N/[K^+]_W$ の値である。なお、e、k、T はそれぞれ電気素量、Boltzmann 定数、絶対温度である。

$$\exp[-eP_{N-W}/kT] = \exp[-0.13e/kT] = 0.0066$$

明らかに実験事実である $[K^+]_N/[K^+]_W = 0.00001$ と大きく異なる。Donnan 理論は実験事実を再現できない。

Ling の吸着理論

では、これら実験事実をどのように説明したらよいのであろうか。半世紀も前に唱えられ、忘れ去られてしまった Ling の吸着理論はこれら実験事実を説明する。まず実験 1 について考えてみる。

<Ling の吸着理論による実験 1 の考察>

Ling は膜電位の発生及びその振る舞いは可動イオンの吸着によって説明可能と主張している。この考えを実験 1 の結果にあてはめてみる。

N-C、S-C、W-C、E-C は固定負電荷を持つ半透膜である。つまりカチオンを吸着する。カチオンは吸着「固定」された状態、あるいは吸着された「可動」状態、これら二つのいずれかの状態(「固定」と「可動」)で存在する。他方 Cl^- は吸着されず、可動イオンとして存在する。例えば、W槽-C槽-E槽の状態をごく単純に図で表すと図 5 のようになる。W-C 及び E-C 内の固定負電荷が H^+ や K^+ を吸着することにより、イオンの不均一分布が Boltzmann 分布に従う形で生じ、その結果図 4 中赤い点線で示された電位分布が生じる。実験で測定された P_{W-E} はまさに図中に示した P_{W-C} と P_{C-E} の差で生じると考えられ、実験事実をうまく説明する。この考えは N槽-C槽-S槽にも適用可能であり、実験事実をうまく説明する。

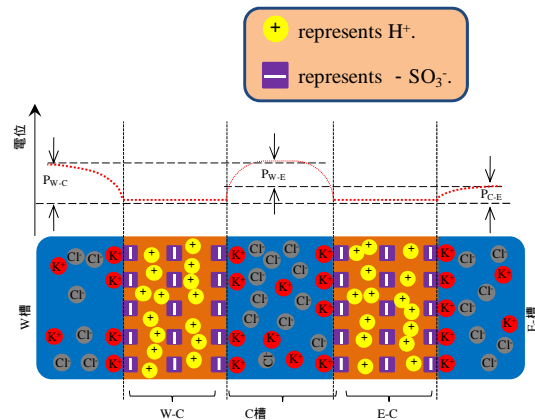


図 5 実験 1 W槽-C槽-E槽のイオン分布

<Ling の吸着理論による実験 2 の考察>

では、同様な考えが適用可能かどうかどうかが実験 2 について考えてみる。

N槽、S槽、W槽、E槽の水溶液を互いに分け隔てる 1-ペンタノールによる液膜が C槽に存在し、この液膜には末端に固定電荷を有する長鎖炭化水素分子が含まれている。 P_{W-E} は W槽-C槽-E槽によって生ずるが、この系内の物質の分布を図 6 に示す。

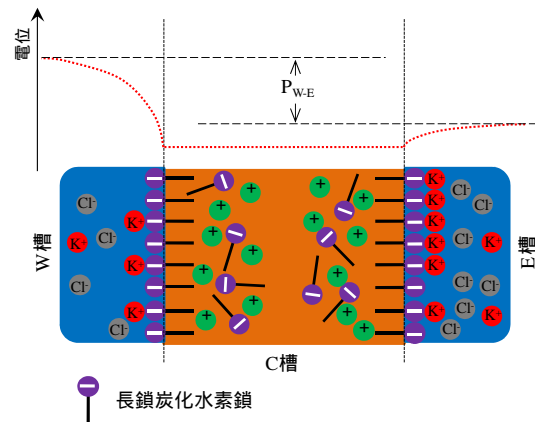


図 6 実験 2 W槽-C槽-E槽のイオン分布

C槽に含まれる長鎖炭化水素鎖分子はその末端負電荷と炭化水素鎖の寄与により W槽-C槽界面と C槽-E槽界面に単分子膜を形成する。このとき、単分子膜は負電荷面を形成することになる。この負電荷は W槽及び E槽の K^+ の吸着サイトとして作用し、これら二槽の K^+ 濃度によって吸着の程度は変化する。 K^+ が単分子膜の吸着サイトに吸着することでその吸着サイトの負電荷は打ち消される。つまり吸着の程度により単分子膜面の電荷密度は変動する。W槽及び E槽の K^+ および Cl^- はこの電荷密度の影響を受けて Boltzmann 分布に従って分布する。このとき生み出される電位分布は図 6 の赤い点線で示された分布になると考えられる。実験で測定された P_{W-E} は、まさに図 6 の P_{W-E} に対応する。これは実験事実をうまく説明する。この

考えは N 槽-C 槽-S 槽にも適用可能であり、実験事実をうまく説明する。

研究成果まとめ

これまで定説 (Donnan 理論、GHK の式) となっていた膜電位発生及びその振る舞いは、「可動イオンの細胞膜透過」に起因するのではなく「可動イオンの吸着固定」に起因すると考えることがより適切である。

この件に関して、40 年ほど前にやはり定説は誤りであり吸着理論が正しいと主張した科学者と偶然知り合い、私は意見を求めた。その科学者の意見は「ほとんどの科学者が定説を教えられてきた。それを覆そうとしても、何年も定説を教えられた人の考えを変えることは出来ないというだけのことである」とのことであった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

H. Tamagawa, Membrane potential generation without ion transport, Ionics, 査読あり, Vol. 21, 2015, pp. 1631-1648.

H. Tamagawa and S. Morita, Membrane Potential Generated by Ion Adsorption, Membranes, 査読あり, Vol. 4, 2014, pp. 257-274.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉川 浩久 (TAMAGAWA Hirohisa)
岐阜大学・工学部・准教授
研究者番号：60324282

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：