

---

## 界面活性剤の生体膜への侵襲機構の解明とそれに対する 防御法の開発

Invasion mechanism of surfactant on the cell membrane

代表研究者	横浜市立大学医学部教授	竹中敏文	
	Prof., Schl. of Med., Yokohama City Univ.		Toshifumi TAKENAKA
協同研究者	横浜市立大学医学部助教授	吉岡亨	
	Assoc. Prof., Schl. of Med., Yokohama City Univ.		Tohru YOSHIOKA
	横浜市立大学医学部講師	堀江秀典	
	Assist. Prof., Schl. of Med., Yokohama City Univ.		Hidenori HORIE
	横浜市立大学医学部助手	堀英明	
	Lect., Schl. of Med., Yokohama City Univ.		Hideaki HORI

Invasion mechanism of surfactant on the cell membrane was studied by using the physiological techniques. Surfactant made of fatty acids having a long carbon chain. It is necessary to study the effects of fatty acids on the nerve cell membrane.

The effects of fatty acids on the Na channel of the nerve membrane was studied by using a voltage clamp in squid giant axon. When 2-decenoic acid was applied externally at 2 mM in artificial sea water, it depolarized the nerve membrane 2-5 mV and eventually blocked the action potential. The membrane resistance was not changed by this chemical. The maximum value of the Na-current was decreased and reached the steady state value at 15 min after application. The fatty acid does not affect the K current. Fatty acids less than 8 carbon atoms have no effect on either Na or K currents. We also compared with the effects of fatty acids of the same chain length. Sebacic acid, having carboxyl groups at both ends of the carbon chain, has no effects on the Na current. 10-hydroxydecanoic acid also has no effect on the Na current or the resting potential. The same tendency toward inhibition of the Na current was observed when these compounds applied intracellularly. These data show that the suppression of the Na current depends on the number of carbon atoms and the chemical structure of the compounds. The effects of these fatty acids on the Na channel was also examined by using voltage clamp and computer simulation. The time constant of *m*-gate,  $\tau_m$ , was increased 2 times compared with control, but the other factors, *h*, *n*, were not changed. This means that the opening velocity of the *m*-gate becomes slow by application of fatty acids. The cell volume also increased by the fatty acids. From the analysis of the video picture, the cell surface area increased about 1.06 times compared with control. This phenomenon related with the increase of the membrane fluidity. These increase might affect the opening of *m*-gate of Na channel. These effects might be considered in so far as fatty acids get into the membrane from the part of lipophilic hydrocarbon chain and as a results of it the opening velocity of the *m*-gate becomes slow. It is therefore of great interest to directly observe the membrane fluidity change caused by these chemicals.

The membrane fluidity was measured by fluorescence photobleaching recovery method. The fluorescent probe was 5-(octadecylthiocarbamylamino) fluorescence, F18. The effective lateral diffusion constant of the membrane was around  $0.35 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec. in control cells,  $0.42 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec in 2-decenoic acid treated cells and  $0.35 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec in valeric acid treated cells. The effective mobilities of the membrane complex increased about 40% by the external application of decenoic acid, while valeric acid increased it only 12%. From the physiological results that 2-decenoic acid inhibits the Na channel, it is suggested that this increase in the membrane fluidity might affect the Na channel.

Long chain fatty acid, like arachidonic acid, is not soluble in the saline water, but soluble in

1 mM  $\alpha$ -cyclodextrin. The effects of arachidonic acid on the membrane was studied by using this solution and found that it inhibited only the Na channel and not K channel.

We also observe the effect of (Trimethyl-*n*-alkylammonium)<sup>+</sup> which has a hydrocarbon chain with *n* carbon atoms. The chemicals inhibited both Na and K currents and half inhibition dose were 600 mM (*n*=8), 150 mM (*n*=10), 40 mM (*n*=12) and 3 mM (*n*=14). These inhibition related with the length of a hydrocarbon chain. These chemicals might penetrate the membrane and attack the channel from the inner side of the membrane.

Saponin, a detergent, has a specific high affinity to cholesterol which is abundant in the plasma membrane. We reported that saponin specially permeabilized the axolemma of axons leaving cytoplasmic structures intact. The particle movement in cytoplasm (axoplasmic transport) was observed in saponin-treated axon by using ATP containing solution. This saponin-treated axon is an useful tool of axoplasmic transport model.

Medium chain fatty acyl Co A dehydrogenase deficiency increased fatty acids C<sub>8</sub>-C<sub>12</sub> in the body fluid and caused a psychological damage. These phenomenon are proved by our experimental results. We also studied that forced sleep is related with the accumulation of fatty acids. Nerve cells can be devided with several groups by the effects of fatty acids. Inhibition of excitation depends on the amount of fatty acids. From these results, we considered that the physiological conditions might be governed by the amount of fatty acids in the body fluid.

## 研究目的

界面活性剤の生体膜に対する効果を生理学的手法を用いて調べ、どのような機構でこの薬物が生体膜を侵襲していくのかを研究するのが主たる目的である。界面活性剤の生体膜に対する作用の発現は、膜の生理学的性質の変化として現れてくる。ところで生体膜の主な機能は興奮性と物質の選択的透過性である。なかでも、神経・筋肉の細胞膜は興奮という生体でいちばん大切な機能を司っている。そこにはいろいろなチャンネルタンパク質がある。我々の体に薬物が害を及ぼすのは、このチャンネルタンパク質が障害されるからである。そこで、まずいちばん薬物効果のある興奮膜を材料としてとり上げ、これに対する界面活性剤の作用を研究していった。

## 研究の成果と経過

### 1. 脂肪酸の興奮抑制

界面活性剤は、長い炭素鎖をもった脂肪酸よりなる。そこでいろいろの長さの炭素鎖をもった脂肪酸の膜に及ぼす効果を研究した。材料としては主にイカの巨大神経線維を用いた。この神経線維は、直径が 0.5~0.8 mm もある太いもので、線維内の原形質を取り除いて細胞内灌流をすることができ、膜の内側からも外側からも自由に薬物を作用させることができる利点がある。膜の性質の

測定には、電気生理学的手法ことに膜電位固定法を用いた。まず膜の静止電位、活動電位、膜抵抗にどのようにこれら薬物が作用するのかをみた。図 1 は 2-decenoate の神経膜に対する作用を調べたもので、横軸は作用時間、AP は活動電位のピーク値、RP は静止電位、下図は膜抵抗を示す。2-decenoate を膜の外側から作用させると約 15 分で膜の興奮性が消失し、静止電位は 4~5 mV 脱分極側に变化する。しかし、膜抵抗は全く変化しない。このことは膜構造が変化していな

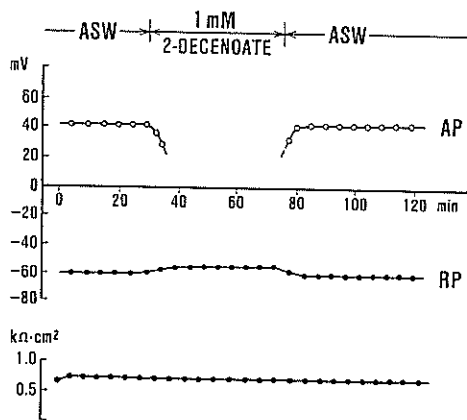


図 1. 2-decenoate の膜電位と膜抵抗に対する作用。  
AP: 活動電位のピーク値, RP: 静止電位の値,  
ASW: 人工海水.

いことを示す。外液より 2-decenoate を除去すると興奮性は完全に回復する。この薬物の興奮抑制は可逆的である。膜の内側から 2-decenoate を作用させても全く同じように可逆的に興奮抑制が起こる。ただし薬物作用発現は 2~3 分で起こる。

2. 膜のどのイオン・チャンネルに作用するか  
 どのイオン・チャンネルに脂肪酸が作用するかを膜電位固定法を用いて調べた。図 2 は膜の内側に 2-decenoate を作用させた時の電流曲線である。下向きの電流は、Na-電流を表し、少しおくれた正の部分は K-電流を表す。薬物投与によって Na-電流のみが減少していることが分かる。Na-電流のピーク値と K-電流の値を膜電位の関数としてプロットしたのが図 3 の電圧-電流曲線である。2-decenoate 投与により Na-電流のピーク値が減少し、しかも正のシフトがみられる。逆転電位はコントロールも薬物投与時も +40 mV で変化しない。K-電流は 2-decenoate により変化しない。薬物投与の効果は、膜の内側からと外側からと同じであり、可逆的である。これらの結果から 2-decenoate は Na-チャンネルに可逆的に作用し、Na-電流を抑制することが分かった。

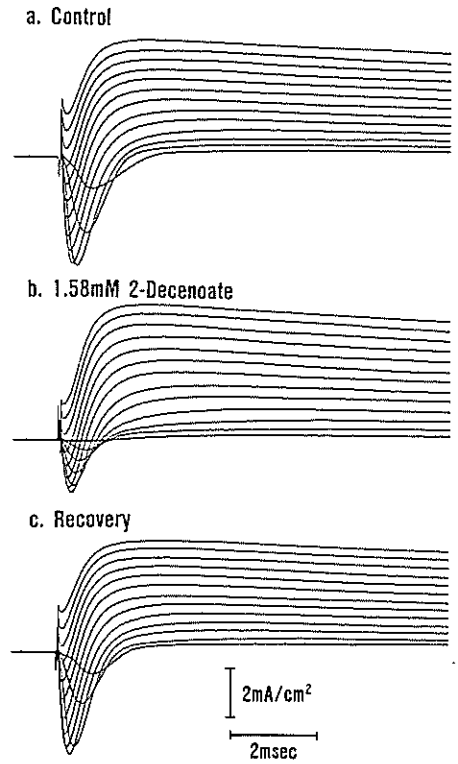


図 2. 膜電位固定法によって測定した膜電流の変化。

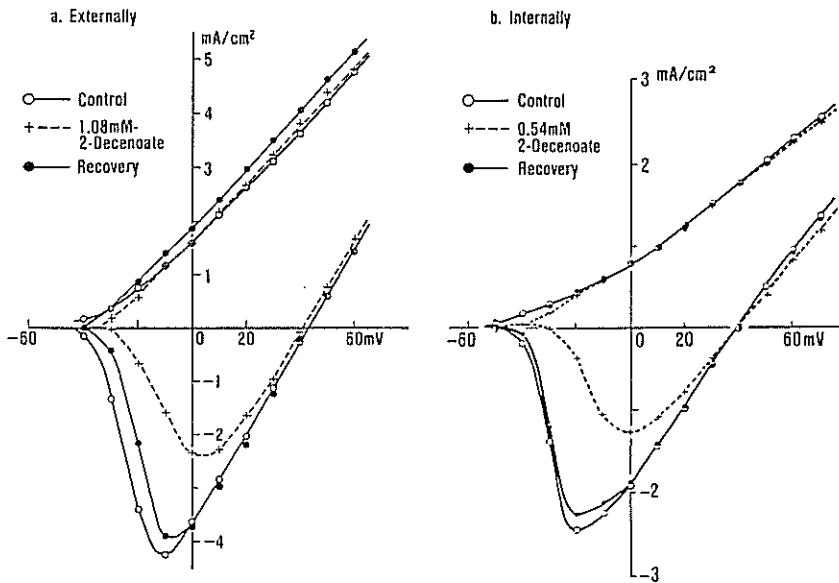


図 3. Na-電流のピーク値と K-電流値に対する 2-decenoate の効果。

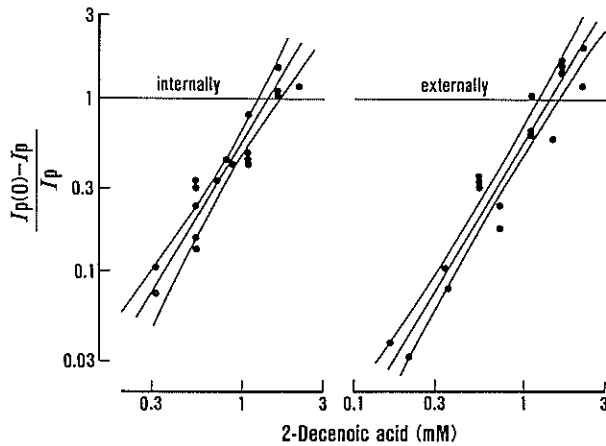


図 4. Na-電流の抑制と 2-decenoate の濃度との関係。

$I_p$ : コントロール Na-電流のピーク値,  $I_p(0)$ : 2-decenoate 作用時の Na-電流のピーク値。

チャンネルのどこにどのように作用するかは後述する。

### 3. 量的関係

膜の外側より 2-decenoate を作用させた時、50% 抑制する量 ( $ED_{50}$ ) は 1.4 mM, 膜の内側より投与した時は 0.8 mM であった。内側投与の方が 2 倍効果があるが、これは膜の外側に付着している結合組織のためかもしれないし、また、薬物のチャンネル作用部位が膜の内側部にあるためかもしれない。図 4 は Hill プロットを示したものである。Hill プロット係数は薬物を内側から投与しても外側から投与の場合も 1.5 位になる。これは 2-decenoate の抑制がチャンネルと 1 対 1 でないことを意味する。

### 4. 種々の脂肪酸の抑制効果

種々の炭素鎖をもった脂肪酸の興奮膜に対する作用を示したのが図 5 と表 1 である。炭素鎖の炭素数が 8 個以上になると抑制効果が出現する。caprylate は  $ED_{50}$  が 16 であり、炭素数が増加するとこの値は約 1/3 ずつ減少していくが、炭素数 11 個以上はほとんど変わらず undecanoate は 0.4, dodecanoate は 0.3, tridecanoate は 0.3 という値である。脂肪酸を興奮膜に対する作用で分類すると三つに分けられる。第 1 群は 2-decenoic acid, capric acid で代表されるもので、主に Na-電流だけを抑制し、 $ED_{50}$  は 1.0 mM 前後

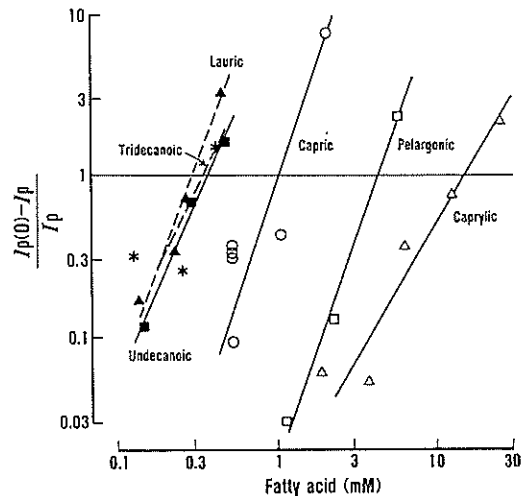


図 5. 各種脂肪酸の Na-電流抑制効果と濃度との関係。

のものである。第 2 群は undecanoic acid に代表され、 $ED_{50}$  は 0.4 mM 以下と小さく、初期には Na-電流のみを抑制するが、徐々に膜電位の脱分極を起こし、最後には不可逆の効果は与える。第 3 群は palmitic acid, linoleic acid などに代表されるもので Na- と K-電流を同時に抑制し、脱分極を起こし、不可逆的に作用して膜を破壊する。

次に同じ長さの炭素鎖をもった脂肪酸を比べてみる。caprate に比べて、2 重結合を 2 の位置

表 1. 各種脂肪酸の Na-電流抑制効果.  
ED<sub>50</sub>: 50% 抑制による濃度. n<sub>H</sub>: Hill 係  
数. (n): 例数

Fatty acid	ED <sub>50</sub>	n <sub>H</sub> (n)
saturated		
Caprylate	16	1.6 (5)
Pelargonate	4.3	2.9 (3)
Caprate	1.1	2.8 (6)
Undecanoate	0.41	2.2 (3)
Dodecanoate	0.32	2.0 (5)
Tridecanoate	0.36	2.1 (3)
unsaturated		
2-Decenoate	1.43	1.66(18)
3-Decenoate	1.2	1.6 (5)
2-Undecenoate	0.46	2.3 (6)
10-Undecenoate	1.04	2.6 (6)
2-Tridecenoate	0.20	5 (3)
OH-		
2-Hydroxy decanoate	0.76	1.63 (8)
3-Hydroxy decanoate	9.6	0.9 (4)
2-Hydroxy undecanoate	0.40	2.8 (3)
3-Hydroxy dodecanoate	0.46	2.0 (7)
externally		
Pelargonate	3.4	2.0 (3)
Caprate	1.7*	
2-Decanoate	1.37	1.67(19)
3-Hydroxy decanoate	6.1	1.5 (2)

にもつ 2-decenoate はあまり変らないが 3 の位置にある 3-decenoate は効果が少し強くなっている。また, carboxyl 基を炭素鎖の両端にもつ sebacic acid は全く抑制効果がない。炭素鎖に OH 基がついた場合, その効果はついている場所によって異なる。炭素数 10 個の場合には 2 の位置についている時は, ない場合と同じ効果であるが, 3 の位置になると効果は 20 倍近くも減り, 炭素 8 個の caprylate と同じになる。10 の位置に OH 基がついた場合には抑制効果はなくなる (表 1)。

この結果から Na-チャンネルの抑制効果は, 炭素鎖の炭素数に関係し, また carboxyl 基や OH 基がついた場合は, そのついた場所によって異なってくるのが分かる。膜は脂質二重層とタンパク質からできているが, この炭素鎖が膜面に垂直に挿入して, ある長さ, つまり 8 個以上膜内に入った場合に抑制効果を現す。このため炭素鎖の

両端に carboxyl 基のついたものは抑制効果を現さないということになる。

### 5. arachidonic acid などの長鎖型の膜に対する効果

長鎖型の脂肪酸は, 水溶液に不溶であるが, 1 mM  $\alpha$ -cyclodextran を用いることにより可溶化することができる。図 6 は, イカの巨大神経線維の内部を灌流して電圧固定を行ない, 膜の Na-電流のピーク値と K-電流をプロットしたものである。Na-電流は arachidonic acid により可逆的に減少しているが, K-電流は変化していないことが分かる。arachidonic acid の濃度を変えながら Na-電流のピーク値をプロットしたのが図 7

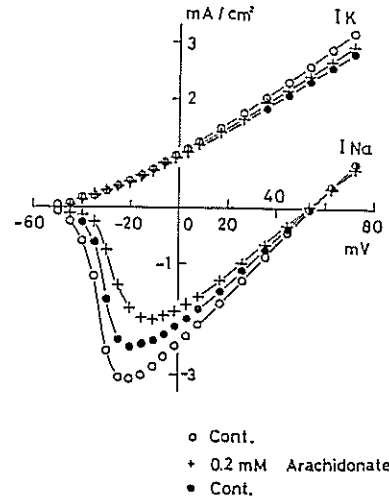


図 6. Arachidonic acid の Na-電流 ( $I_{Na}$ ) と K-電流 ( $I_K$ ) の抑制。

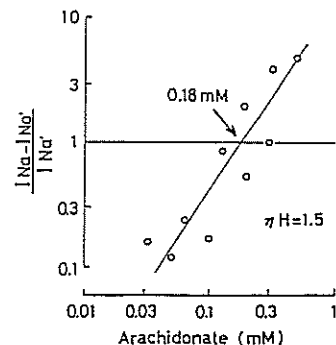


図 7. Arachidonic acid の Na-電流に対する Hill plot.

で、Hill 係数は 1.5 となる。この値は 2-decenoic acid の場合と同じである。arachidonic acid も Na-チャンネルにのみ作用し、その作用機序も他の中鎖の脂肪酸と同じである。

6. チャンネルのどこに作用するか

2-decenoate のような脂肪酸は、興奮膜の Na-電流を可逆的に抑制する。このとき最大電流は正にシフトし、最大コンダクタンスは変わらないので、Na-電流を抑える代表的薬物であるフグ毒の tetrodotoxin とは作用機序が異なる。電圧固定法で得た膜電流曲線を次の式で解析する。

$$I_{Na} = I'_{Na} [1 - \exp(-t/\tau_m)]^2 [h_\infty (1 - \exp(-t/\tau_h)) + \exp(-t/\tau_h)]$$

$I_{Na}$  は Na-電流、 $I'_{Na}$  は最大 Na-電流、 $m$  と  $h$  は Hodgkin の Na 説での活性化因子と不活性化因子である。

図 8 は  $m$  の最大値  $m_\infty$  と時定数  $\tau_m$  を膜電位の関数としてプロットしたものである。1.25 mM の 2-decenoate により 20 mV 正の方向つまり脱分極側にシフトしている。同じ膜電位で比べると

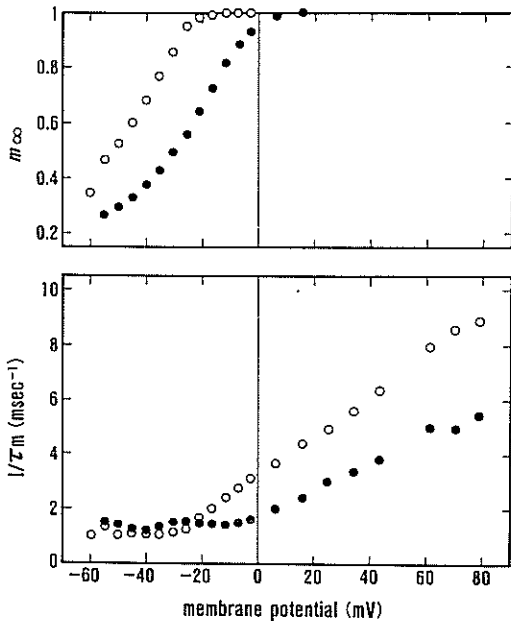


図 8. 2-decenoate の Hodgkin-Huxley パラメーター  $m$  に対する効果。  
○: コントロール; ●: 2-decenoate;  $\tau$ : 時定数。

薬物投与の時は 50% 減少している。 $1/\tau_m$  が減少するということは  $m$  ゲートの開く時間が増加していることを示している。図 9 は不活性化因子に関する図である。2-decenoate 投与によって、 $h$  の

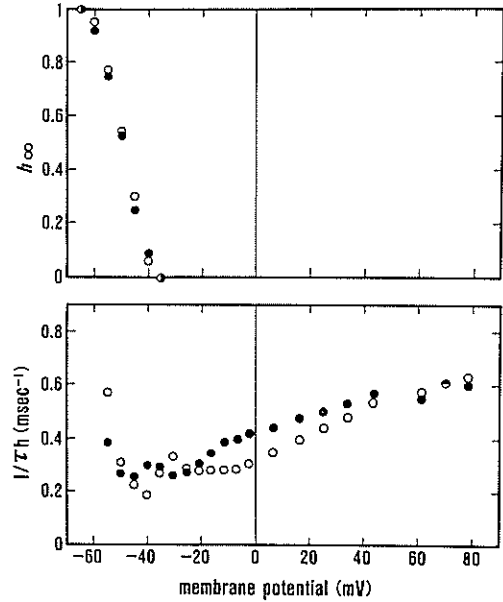


図 9. 2-decenoate の  $h$  ゲートに対する作用。

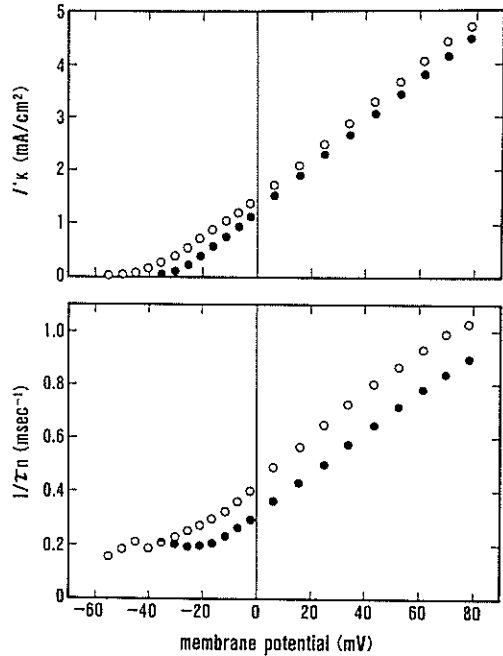


図 10. 2-decenoate の  $n$  ゲートに対する作用。

最大値は変化しないが、時定数の逆数  $1/\tau_h$  は 20 mV 過分極側に移動している。しかし、それらの値は大きく変化していない。 $h$  ゲートは大きな変化を受けていないことになる。K-電流の関係する  $h$  ゲートの状態図が図 10 である。時定数の逆数  $1/\tau_h$  は、やはり正の方向脱分極側に 20 mV シフトしている。しかしそれほど大きな変化はみとめられない。2-decenoate は Na-チャンネルの  $m$  ゲートに働き、このゲートの開く速度を遅くすると結論できる。

### 7. 膜の流動性に対する効果

脂肪酸が膜に作用したとき、膜の流動性がどのように変化するかを研究した。膜の流動性は、蛍光退色回復法 (Flourescence Photobleaching Recovery method, FPR 法) を用いた。FPR 法は、蛍光色素のついた脂肪酸を膜に作用させた後、膜の微小部分  $1 \mu^2$  の蛍光を測定しながら、その部分の蛍光をレーザー光線で破壊し、その後の蛍光強度の回復過程から膜の拡散係数を算出する方法である。蛍光色素としては、5-octadecylthiocarbamoylamino fluorescein (F18) という炭素数 18 の脂肪酸に蛍光物質のついたものを用いた。F18 は 488 nm の光で励起され 520 nm の波長の光がでる。トリ胚の脊髄後根神経の培養細胞を F18 の液に 10 分間浸し、その後洗浄する。この膜を蛍光色素で染めた標本に弱いレーザー光を照射し、放射される光を測定し、次に 1000 倍にレーザー光を強めて照射し光退色させるとその部位からの蛍光は消失する。その後の蛍光の回復過程の時間経過を測定し膜流動性を測定する。表 2 は一つの細胞の膜の拡散定数で、コントロール

表 2. 2-decenoic acid ( $D_{10}$ ) の膜流動性に対する効果。1 個の細胞でコントロール、次に  $D_{10}$  と繰り返し測定している。

	$f$	$\tau_{1/2}$ (sec)	$D$ (cm <sup>2</sup> /sec)
Control	0.96	12.0	$0.26 \times 10^{-8}$
$D_{10}$	0.95	6.2	$0.50 \times 10^{-8}$
Control	0.97	12.6	$0.25 \times 10^{-8}$
$D_{10}$	0.92	7.2	$0.43 \times 10^{-8}$
Control	1.00	10.5	$0.30 \times 10^{-8}$

$f$ : 流動率,  $\tau_{1/2}$ : 50% 回復時間,  $D$ : 拡散定数。

表 3. 2-decenoic acid ( $D_{10}$ ) と valeric acid ( $V_6$ ) の膜流動性に及ぼす効果。

	$n$	$\tau_{1/2}$ (sec)	$D \times 10^{-8}$ (cm <sup>2</sup> /sec)
Control	30	$10.5 \pm 2.3$	$0.30 \pm 0.05$
$D_{10}$	26	$2.6 \pm 2.6$	$0.42 \pm 0.04$
$V_6$	6	$8.9 \pm 1.4$	$0.35 \pm 0.05$

$n$ : 測定細胞数,  $\tau_{1/2}$ : 50% 回復時間,  $D$ : 拡散定数。

と 2-decenoate 投与とを繰り返し流動性を測定したものである。この表から 2-decenoate は拡散定数を 40~50% 可逆的に増加させることが分かる。表 3 は炭素数 5 個の valeric acid と炭素数 10 個の 2-decenoate の膜流動性に対する作用を比較したものである。膜脂質の拡散定数は、コントロールでは  $0.30 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec であるが、興奮を抑制する 2-decenoate を与えると  $0.42 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec となり約 40% の増加がみられる。これに対し、興奮を抑制しない volerate を与えると拡散定数は  $0.35 \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/sec であり、大した増加はみられない。この結果から脂肪酸は膜の流動性を増大させ、その結果 Na-チャンネルに影響を及ぼすことが分かった。

### 8. 脂肪酸による細胞の膨大

炭素数 8 個以上の鎖をもつ脂肪酸を与えると興奮性は抑制され、膜流動性は増加することが分かった。もしそうならば細胞自体の大きさは変化するのであろうかということで実験を行なった。培養神経細胞をノマルスキー微分干渉顕微鏡で観察し、その像をさらにビデオ増幅して 50 nm の感度で測定しうる状態で研究を行なった。その結果を示したのが表 4 であり、2-decenoate 投与に

表 4. 2-decenoate による神経細胞の直径の変化

	control ( $\mu$ m)	→ 2-decenoic acid ( $\mu$ m)	→ control ( $\mu$ m)
Cell 1.	21.6	23.5 (1.09)	22.5 (1.04)
Cell 2.	22.0	23.7 (1.08)	22.2 (1.00)
Cell 3.	35.1	36.6 (1.04)	35.2 (1.00)
Cell 4.	29.8	32.0 (1.07)	31.1 (1.04)
Cell 5.	33.5	35.9 (1.07)	34.6 (1.03)
Cell 6.	37.0	40.0 (1.08)	36.8 (0.99)
Cell 7.	44.0	46.2 (1.05)	45.0 (1.02)

(1.06±0.01) (1.02±0.02)

The change of chemosensitivity of Ach-receptor

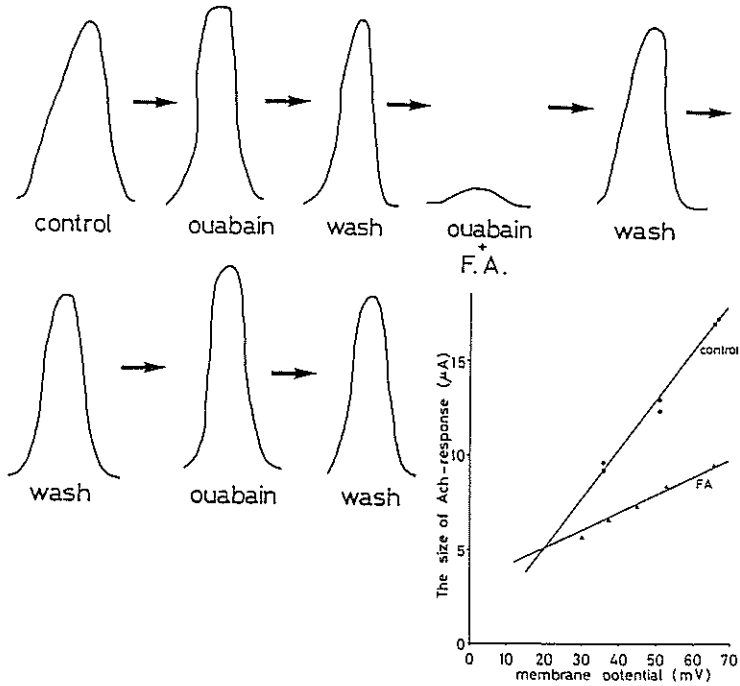


図 11. Achetylcholine 受容器電位の脂肪酸による変化。  
ouabain 非感受性のものが脂肪酸により ouabain 感受性になる。

The Change of the Electrophysiological Activity  
of Snail Neuron by the Application of Fatty Acid

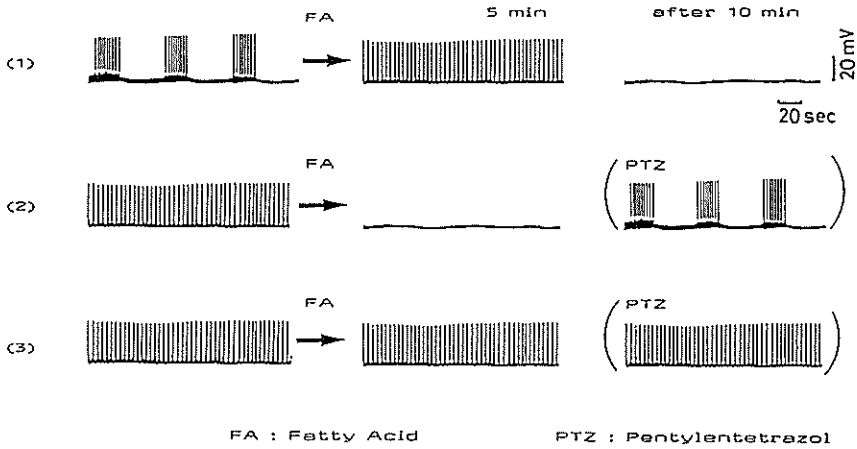


図 12. カタツムリの神経細胞の bursting cell と non-bursting cell に対する脂肪酸 (FA) の効果。脂肪酸の抑制効果のある細胞とない細胞がある。



より細胞体の直径は 1.06 倍に増大している。体積は 1.19 倍になっている。膜表面積が 1.12 倍になる結果として、Na-チャンネルの機能、特に m ゲートの機能が抑制されたと考えられる。

### 9. 細胞膜にある acetylcholine 受容器の変化

Acetylcholine 受容器としてカタツムリの神経細胞を使用した。受容器電位には、ouabain を投与して acetylcholine 反応をみた場合、受容器電位の減少するもの (ouabain-感受性) と変化しないもの (ouabain-非感受性) のものがある。ouabain-非感受性の細胞に 2-decenoate と ouabain を同時に作用させると ouabain-非感受性細胞が ouabain-感受性になる。この現象は可逆的であり、2-decenoate を除去すると再び ouabain-非感受性反応になる (図 11)。図 11 の右下のグラフは、ouabain-非感受性 acetylcholin 反応の細胞に 2-decenoate を投与した時の acetylcholin 反応の大きさを膜電位を横軸にとってプロットしたものである。いろいろの膜電位で acetylcholin 反応が減少していることが分かる。このことは、acetylcholin 受容器タンパク質が機能を発現するとき、ATPase と関係し、2-decenoate はこの活性化に作用すると考えられる。これに関する研究は今後更に継続していきたい。

### 10. 脂肪酸による神経細胞の分類

カタツムリの神経節の細胞には、図 12 に示すように bursting 型と spontaneous discharge 型とがある。bursting 型に 2-decenoate を投与すると bursting は spontaneous discharge となり 10 分後には活動電位は全く抑えられる。ところが、spontaneous discharge 型に 2-decenoate を与えると活動電位が抑制されるものと、全く影響を受けない細胞がある。前者は pentylentetrazol で bursting 型になり、後者は影響を受けない。脂肪酸の作用機序と pentylentetrazol の作用機序との間に何か関連があることになる。

### 11. Trimethyl-n-alkylammonium の興奮に及ぼす作用

脂肪酸の親水基である carboxyl 基のかわりに他の残基をもつ試薬を神経膜に作用させ、その効果を調べることにより脂肪酸の興奮現象に及ぼす作用機序を解明することができる。その試薬の一つとして、炭素鎖をもった TMA (Tetramethylammonium) の類似物質である Trimethyl-n-alkylammonium を用いた。[Trimethyl-n-alkylammonium]<sup>+</sup> は炭素数は 8~18 個のものを用いた。これらの試薬は、Na-電流、K-電流を可逆的に抑制する。図 13 は、Na-電流抑制の dose-response 曲線を示したものである。縦軸は抑制された電流のコントロール電流に対する割合であ

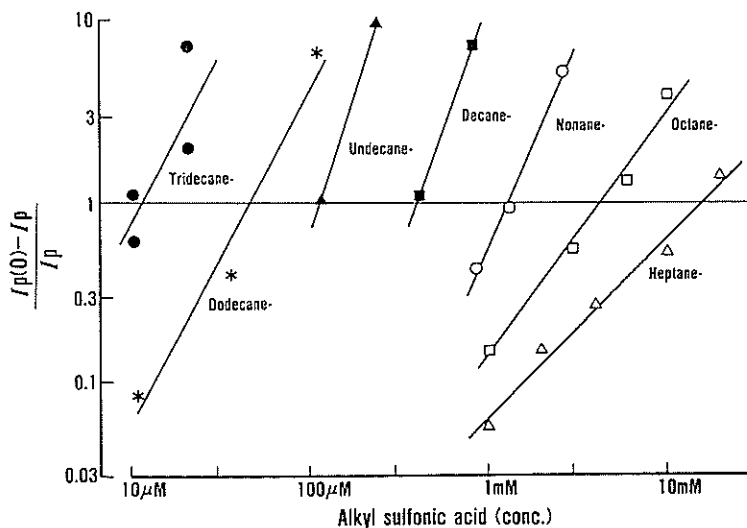


図 13. 各種 alkyl sulfonic acid の Na 電流抑制効果と濃度との関係。

る。Na-電流の抑制は、炭素数が一つ増すごとに約3倍ずつ増加している。Hill plot 係数は炭素数 10 個のときは 1.5 位だが、炭素数が減っていくと 1.0 に近づいていく。これは alkyl 基の関与が徐々に小さくなっていくためと考えられる。炭素原子数が 16, 18 になると不可逆的な脱分極が起これ、炭素原子数 14 までのものとは異なった作用を示す。次に、この試薬が膜のどちら側から作用するかを調べた。これは、神経細胞内灌流して [Trimethyl-*n*-alkylammonium]<sup>+</sup> を外側から作用させ、灌流を停止したり、再灌流して調べた。停止時には Na-電流、K-電流ともに強く減少する。

そして灌流を再開すると再電流の増加がみられる。このことから [Trimethyl- $\alpha$ -alkylammonium]<sup>+</sup> は膜の内側から作用していると考えられる。

TMA<sup>+</sup> 自身は神経膜の内側や外側から作用させても Na-電流、K-電流に影響を及ぼさない。ところが炭素原子 8~18 個の炭素鎖をもった [Trimethyl-*n*-alkylammonium]<sup>+</sup> は両電流を可逆的に抑制する。この抑制効果は炭素数が増えるほど強くなる。また、薬物投与後、神経線維内灌流を停止すると Na-電流、K-電流はさらに減少し、灌流を再開すると Na-電流、K-電流は回復する。このことから薬物の作用点は膜の内側にあると考えられる。

12. 膜を界面活性剤で破壊した時の軸索輸送 saponin を膜に短時間作用させると 10 nm ぐらゐの穴がいくつもできる。このような神経線維でも軸索輸送が継続している。この場合使用した溶液は、イカ神経線維の場合 400 mM K-glutamate, 150 mM glycine, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ATP, 1 mM EGTA, 20 mM HEPES であった。この中で ATP がいちばん大切で、ATP を除去すると軸索輸送は停止する。また、Ca<sup>++</sup> を EGTA で除去あるいは一定値にしないといけない。この実験モデルは我々のところと米国の Forman のところでそれぞれ別々に開発された。この用途は広く、膜を通過できないような大きな薬物分子も軸索内に作用させることができるので今後の軸索

内輸送の研究に役立つ。とくに界面活性剤の膜に対する作用を研究するとき、定常的に膜の材料を供給している軸索輸送の研究は重大な意味をもつ。

#### 考察と今後の課題

界面活性剤は、長い炭素鎖をもつ脂肪酸よりなる。そこでまず、種々の長さの炭素鎖をもった脂肪酸の膜に対する効果を調べた。材料は、生体膜の中でいちばん複雑かつ重要な役割りをしている興奮膜を使用した。その結果、脂肪酸は神経の興奮を抑制することが分かった。この抑制作用には炭素鎖の長さや化学構造の二つが関係する。炭素数 8 個以上の脂肪酸は興奮の抑制効果を占める。また、化学構造の関与についても sebacic acid のように炭素鎖の両端に carboxyl 基をもつものは、興奮を全く抑制しない。つまり、炭素鎖の末端または端の方に COO-基や OH-基のついた脂肪酸は抑制効果を現さない。次に脂肪酸が膜の動的構造にどのような作用を及ぼすかをみた。膜の流動性に対する脂肪酸の効果の研究には蛍光退色法を用いた。その結果、脂肪酸を膜に作用させると、膜脂質の流動性が 40% も増加し、しかも増加のある時のみ興奮が抑制されることが分かった。また、流動性の増加に伴い細胞の容積、表面積が増加することも分かった。それでは、膜の興奮を抑制機構はどのようなものか。電圧固定法の実験結果から主に Na-チャンネルの抑制であることが証明された。そして、この抑制は Na-チャンネルタンパク質の *h* ゲートではなく *m* ゲートに対してである。つまり、*m* ゲートが開くのを遅らせることにあった。

脂肪酸代謝異常による病気、例えば medium chain fatty acyl CoA dehydrogenase deficiency では、C<sub>8</sub>~C<sub>12</sub> の炭素鎖をもつ脂肪酸の酸化ができず、その結果  $\omega$ -oxidation が起これ、体内に dicarboxylic acid としてたまるのが特徴なので C<sub>8</sub>~C<sub>12</sub> の脂肪酸も普通の人に比して増加している。このため本研究でみられたような障害が出現する。

生理的状态で存在する arachidonic acid の場合も、正常より少し多く存在すると Na-チャネル

ルの  $m$  ゲートの開きが遅くなり、興奮を抑制する。ところが神経細胞にも同じ濃度で脂肪酸を与えると、抑制効果のあるものとないものの2種類があることが分かった。中枢神経系の細胞にも、脂肪酸の閾値濃度の異なる細胞、または全く効果のない細胞が存在するに違いない。また断眠ラットでは、脳に脂肪酸の増量がみられた(未発表)。これらの結果を総合してみると、我々の疲労、睡気といった生理状態の良し悪しは、これら脂肪酸の作用によるものと考えられる。このような生理状態といった未開の分野に今後研究分野を広げていきたい。

## 文 献

- 1) Takenaka, T., Horie, H., and Hori, H.: Effects of Myrmecic acid and their analogous compounds on the sodium channel in the squid giant axon., *Soc. of Neurosci. Abstracts*, **8**, 251 (1982).
- 2) Takenaka, T., Horie, H. and Kawasaki, Y.: Effect of fatty Acids on the Membrane Fluidity of Cultured Chick Dorsal Root Ganglion Measured by Fluorescence Photobleaching Recovery. *J. Neurobiol.*, **14**, 457-461 (1983).
- 3) Gotoh, H., Takenaka, T. and Shozushima, M.: The Fibrillar Network in the Cytoplasm of Squid Giant Axon Extracted with Saponin. *Cell Struct. and Function.*, **8**, 11-18 (1983).
- 4) Horie, H. Takenaka, T. and Kaiho, M.: Effects of Disruption of Microtubules on Translocation of Particles and Morphology in Tissue Cultured Nerve. *Brain Res.*, **288**, 85-93 (1983).
- 5) Takenaka, T., Horie, H. and Kawasaki, Y.: Effects of Fatty Acids on the Membrane Fluidity in the Tissue Cultured Dorsal Root Ganglion Cells. *J. Neurochem.*, **41**, suppl., S40 (1983).
- 6) Takenaka, T., Horie, H. and Hori, H.: Effects of Fatty Acids on the Sodium-Current in the Squid Giant Axon Membrane; Physiological Role of Phospholipids in the Nervous System. International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, at Harrison Hot Springs, Canada, 1983.
- 7) Takenaka, T., Natsume, K. and Waku, K.: Axoplasmic Transport of Phospholipids in Rat Sciatic Nerves.: Physiological Role of Phospholipids in the Nervous System. International Society for Neurochemistry Satellite Meeting, at Harrison Hot Springs, Canada, 1983.
- 8) Horie, H., Maeda, T. and Takenaka, T.: Inhibition Process of Axoplasmic Transport by Colochicine in Cultured Nerve Cells. *J. Physiol. Soc. Jap.*, **45**, 385 (1983).
- 9) Takenaka, T., Horie, H. and Hori, H.: Fatty Acids and the Excitability of the Squid Giant Axon. *J. Physiol. Soc. Japan*, **45**, 409 (1983).
- 10) Horie, H., Takenaka, T., Hori, H. and Maeda, T.: Effects of Decyltrimethylammonium on Ionic Channels of the Squid Giant Axon. *Abstracts Society for Neuroscience*, **9**, part 1, 502 (1983).
- 11) Takenaka, T.: Particle Movements in the Axon and a Simulated Kinetic Model of Axoplasmic Transport. International Symposium on Perspectives of Neuroscience from Molecule to mind. Japan Medical Research Foundation, at Hotel the Century Hyatt, Tokyo, Oct. 12-14, 1983.
- 12) Takenaka, T., Horie, H., Hori, H. and Kawasaki, Y.: Effects of Fatty Acids on the Excitable Membrane.; Seiriken Conference, Membrane Excitation and Macromolecules, at Seiriken, Dec. 8-9, 1983.
- 13) Takenaka, T. and Gotoh, H.: Simulation of Axoplasmic Transport. *J. Theor. Biol.*, **107**, 579-601 (1984).
- 14) Gotoh, H., and Takenaka, T.: Particle Movement in Squid Axons Permeabilized with Saponin. *J. Neurobiol.*, **3**, 239-245 (1984).
- 15) Gotoh, H., Takenaka, T., and Sato, M.: Lightmicroscopic observation of Axoplasmic Transport in Saponin Model of Squid Fin Nerve. *Neurosci. Letters. Suppl.*, **17**, S78 (1984).
- 16) Horie, H., Kawasaki, Y., and Takenaka, T.: Lateral Diffusion of Membrane Lipids Changes with Aging in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons. *Soc. for Neurosci. Abstr.*, **10** part 1, 449 (1984).
- 17) Gotoh, H., Takenaka, T., and Sato, M.: Axoplasmic Transport in the Saponinized Axon. Organelles as Tracks and Force Generating Mechanism. *Soc. Neurosci. Abstr.*, **10**, part 1, 356 (1984).
- 18) Horie, H., Takenaka, T., and Hori, H.: Effect of TMA<sup>+</sup> Analogue (Trimethyl-N-Alkylammonium)<sup>+</sup> on ionic channels of the squid giant axon. *J. Physiol. Soc. Japan.*, **46**, 353 (1984).
- 19) Takenaka, T., Hori, H., and Horie, H.: Effect of Aliphatic Sulfonic Acids on the Excitable Membrane in the Squid Giant Axon. *J. Physiol. Soc. Japan.*, **46**, 354 (1984).
- 20) Gotoh, H., Takenaka, T., and Sato, M.: The

- Role of Cytoskeleton in Particle Transport in Saponized Axon. *J. Physiol. Soc. Japan.*, **46**, 422 (1984).
- 21) Gotoh, H., Takenaka, T., Inada, K., and Hiramoto, Y.: Organelle motility in Rat Pituitary Tumor Cells in Culture, 3rd Int. Congr. on Cell Biology, 26-31, 1984.
- 22) Takenaka, T., Gotoh, H., and Horie, H.: Particle Movements and Microtubules in Axoplasmic Transport.: Perspectives on Neurosciences from Molecule to Mind. Edited by Tsukada, Y., University of Tokyo Press, 81-90, 1985.
- 23) Horie, H., Kawasaki, Y., and Takenaka, T.: Lateral Diffusion of Membrane Lipids Changes with Aging in C57BL Mouse Dorsal Root Ganglion neurons from a Fetal Stage to an Aged Stage. *Brain Res.*, 1986 in press.
- 24) Suleymanian, M. A., Takenaka, T., Stamboltsyan, K. V., Ayrapetyan, S. N.: The Effects of Short-chain Fatty Acids on the Neuronal Membrane Functions of *Helix Pomatia*. 1. Electrical Properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, in press.
- 25) Arvanov, V. L., Takenaka, T., Dadalian, S. S., Ayrapetyan, S. N.: The Effects of Short-chain Fatty Acids on the Neuronal Membrane Functions of *Helix Pomatia*. 2. Cholinergic Properties. *Comp. Biochem. Physiol.*, in press.
- 26) Saghian, A. A., Dadalian, S. S., Takenaka, T., Ayrapetyan, S. N.: The Effects of Short-chain Fatty acids on the Neuronal Membrane Functions of *Helix Pomatia*. 3. Na Efflux from the Cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, in press.
- 27) 後藤秀機, 竹中敏文: サボニンモデルと細胞内運動機序—神経軸索輸送を中心に—, 生体の科学, **35**, 232-239 (1984).
- 28) 後藤秀機, 松本光比古, 竹中敏文. 佐藤 誠: 軸索輸送—その機構研究の新展開, 日本生理誌, **46**, 87-98 (1984).
- 29) 竹中敏文, 石川春律, 星 猛, 藤田道也: 細胞膜研究と臨床, 臨床検査, **28**, 678-688 (1984).
- 30) 竹中敏文: 粒子の動きと軸索輸送, 蛋白質, 核酸, 酵素, **29**, 1223-1231 (1984).
- 31) 竹中敏文: ヤリイカ巨大線維と興奮膜, 膜, **9**, 183 (1984).
- 32) Hori, H., Horie, H. and Takenaka, T.: Effects of 2-decenoate and the other fatty acids on membrane currents in the squid giant axon. submitted.
- 33) Takenaka, T., Horie, H., Hori, H. and Kawasaki, Y.: The correlation between the lateral motion of membrane lipids and nerve membrane Excitability., *Biomed. Res.*, **7**, 49-51 (1986).