

パッチクランプ法における温度依存的な活性化電流観察

Methods for measuring temperature-dependent currents in patch-clamp

曾我部 隆彰

(自然科学研究機構 生命創成探究センター 温度生物学研究グループ)

TRP チャネルなどの温度依存的な電流を計測するには、細胞外液全体を加熱しながら熱電対やサーミスタで温度計測する方法がよく用いられる。また最近では、近赤外(IR)レーザーを用いた局所的な加熱と温度感受性蛍光プローブによる計測方法も技術的に可能になってきた。ここでは温度による活性化電流を観察する際の留意点と、各測定方法の特徴について説明する。

温度刺激を加える際の留意点

パッチクランプにおいて一番問題となるのが温度変化によるガラスの変形である。溶液を満たした測定チャンバーを加温・冷却すると、チャンバー底面のガラス、細胞が接着したカバーガラス、測定電極がわずかに歪む。さらに、カバーガラスの下に気泡があると膨張・収縮してガラスが動くこともある。これらは電極と細胞間のギガシールの破断につながるため、ホールセルクランプ後にガラス電極を細胞ごと持ち上げる手順を加える。この操作が可能なのはガラス面への接着が弱い HEK293 細胞などで、トリプシン処理が必須な細胞は向いていない。ただし、15~35℃の範囲内であればリフトなしで測定できる場合もある。

重力落下式の灌流であれば予め 60℃に保温した溶液で 50℃程度まで、氷冷した溶液で 10℃程度まで 10~30 秒で到達できる(図 1)。灌流刺激の場合は温度の変化率が流速、流路の径と長さ、チャンバー形状、液面の高さに影響されるため、定量的な温度負荷にはこれらの条件に加えてリフトする細胞の高さを固定し、細胞を流路の中央に配置することが重要となる。チャンバー自体を加熱・冷却することで緩やかな温度刺激も可能だが、活性化電流は小さくなり観測しにくくなる。温度刺激の別法として、灌流チューブをペルチェ素子で覆い細胞周辺をローカルに温度刺激する系も開発されており、リフトのステップを回避できる(文献 1)。また温度変化にともなって、細胞外液とピペット内液との間に生じる液間電位差(liquid junction potential)が有意に変化する。具体的には 25℃から 45℃までの温度上昇で 5 mV 程度である(文献 2)。特に、反転電位やイオン透過性を計算する場合には考慮したい点である。

温度計を用いた温度計測

パッチクランプを施した細胞周辺の温度を計測するために、我々は Warner Instruments 社の温度負荷・測定装置(TC-344B)とサーミスタ(TA-29)を利用しており、温度信号(1 kHz)を A/D コンバータで処理して pClamp で電流と温度を同時記録している。ヘッドステージの反対側にマニピュレータでサーミスタを固定し、先端を細胞から約 50μm 横まで近づける(図 2)。サーミスタは顕微鏡下では巨大で近づけるのに慣れがいるが、測定温度の精度を上げるために必須である。この測定方法はシンプルで導入しやすい一方で、測定値が実際の細胞(膜)の温度変化をどれくらい正確に反映しているか分からないのが欠点である。ちなみに、アフリカツメガエル卵母細胞を使った電流測定でも同様の温度計測は可能だが、巨大な細胞全体(直径 1 mm)へ一様に温度刺激を負荷することは難しく、活性化温度閾値の厳密な定量には向いていない。

温度感受性プローブを用いた温度計測

近年、細胞内の温度を蛍光で観察できるプローブが開発され、温度計測の空間的解像度が飛躍的に向上した(「蛍光性ポリマー温度センサー」、「遺伝子導入が可能な蛍光性温度センサー」、および「細胞内蛍光性タンパク質温度センサー tsGFP」の項を参照)。これらによって、TRP チャンネルの温度依存的電流を計測しながら、チャンネルが局在する細胞膜領域の温度変化を定量化できる技術基盤が整ったといえる。このシステムは我々も実用化に向けて構築中であり、参考までにいくつかのポイントを記す。まず温度変化を蛍光強度で測定するので、強い光源、高感度のカメラ、温度プローブの励起・蛍光に対応するフィルターやスプリッターが欠かせない。また、前述のように細胞をリフトすると温度変化によって細胞が動き回るためイメージングには適さない。共焦点顕微鏡とパッチクランプを組み合わせ、IR レーザーで細胞一個を局所加熱すればガラスの変形や細胞の動きは無視できるレベルになり、理論的には細胞膜の温度変化を観測しながら温度依存的な電流の発生を捉えることができる。しかし、共焦点顕微鏡のシステムではROIをスキャンする時間が律速となって、温度測定の時間分解能が温度計を用いた方法より著しく劣るのが大きな課題である。

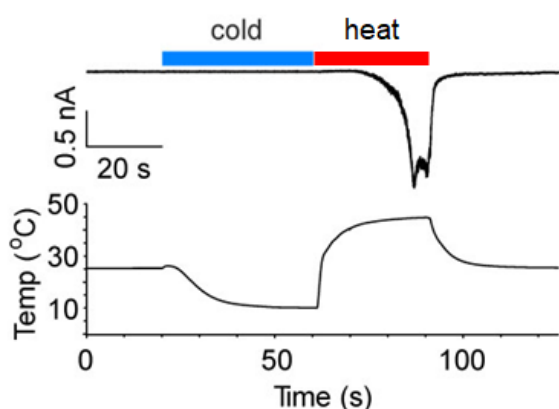


図 1. 灌流による温度刺激とショウジョウバエ Painless チャンネルの熱活性化電流の例

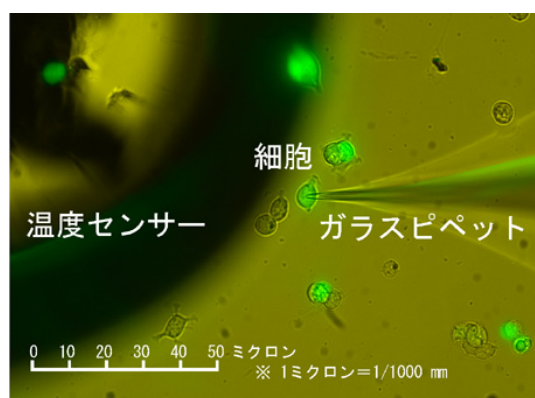


図 2. 測定電極とサーミスタの位置

参考文献:

- 1) Dittert I et al. *J. Neurosci. Methods* 151: 178-185 (2006)
- 2) Sokabe T et al. *J. Neurosci.* 28: 9929 -9938 (2008)