1版

様 式 C－19、F－19－1、Z－19 (共通)

科研費 KAKENHI

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：37104
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2019
課題番号：16K08509

研究課題名（和文）K+の電気化学ポテンシャル依存的チャネル開閉機構の研究

研究課題名（英文）The mechanism for the channel gating which depends on the electrochemical gradient for K+

研究代表者
柳 圭子（石原圭子）（Ishihara, Keiko）

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：70265990

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,600,000円

研究成果の概要（和文）：内向き整流性カリウム（K+）チャネルは心筋の静止電位や活動電位波形を決める背景K+チャネルである。このチャネルの電位依存性は細胞内のポリアミン等の不透過の陽イオンがチャネルをブロックすることで生じるとされるが、細胞外K+濃度が変化するとそれらのブロックの電位依存性は細胞内外のK+濃度勾配と電位差で決まるK+の電気化学ポテンシャル勾配に事実上依存して電位軸上を移動する。そのメカニズムは古典的には細胞外からチャネルに進入するK+と細胞内陽イオンによるブロックが競合するノック・オフ機構で説明され、細胞内K+濃度には依存しないとされてきたが、本研究で新たに細胞内K+もブロックを制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
医学的に血漿K+濃度の増減は特に不整脈のリスクの点で注意を要し、心電図所見は逆に血漿K+濃度の異常を知る手がかりとなることがよく知られている。これらは高あるいは低K+血症によって生じる内向き整流性K+電流の変化が心筋組織内の興奮伝播速度や再分極／活動電位持続時間などに変化をもたらすことによる。したがって内向き整流性K+チャネルが示す特異な細胞外K+濃度依存性の分子メカニズムは医学的にも重要であるが、まだ意外なほど分かっていない。本研究は今後のチャネルタンパクの構造解析や分子動力学シミュレーションを用いたその解明において必須の分子機能に関する情報を従来の電気生理学的手法を用いて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The inward rectifier potassium (K+) channel is the background K+ channel that determines the resting potential and action potential waveform of the myocardium. The voltage dependence of this channel is said to occur by a block of the channel by impermeable intracellular cations such as polyamines. When extracellular K+ concentration is changed, the voltage-dependence of the block shifts along the voltage axis apparently depending on the electrochemical potential gradient of K+ which is determined by the potential difference and the K+ concentration difference across the membrane. The mechanism for this extracellular K+ concentration dependence is classically explained by a knock-off mechanism in which K+ ion coming from the outside competes with the blockages, and it has been considered that it does not depend on intracellular K+ concentration. In this study, however, we showed that intracellular K+ ions indeed control the block.

研究分野：生理学

キーワード：イオンチャネル　カリウムイオン　カリウムチャネル　パッチクランプ　ポリアミン　内向き整流性

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## １．研究開始当初の背景

心筋の静止電位を決める内向き整流性 $K^+$チャネルの強い内向き整流性（脱分極による外向き電流抑制）は、膜電位変化で生じるチャネルの構造変化（ゲーティング）が引き起こすのでは無く、普遍的に細胞内に存在する有機分子のポリアミン（スペルミン、スペルミジン）などの不透過の陽イオンが静電的な相互作用によってチャネル内に進入して $K^+$選択フィルターを通過できずに留まり、$K^+$透過をブロックすることによるとされている。しかし、内向き整流性を示す電流—電圧関係は細胞外[$K^+$]が変化すると、$K^+$の平衡電位（$E_K$）の変化に連動して電位軸上を移動し、あたかもブロックは $K^+$の電気化学ポテンシャル勾配（$K^+$の移動を駆動する力）、すなわち $K^+$の流れによって生じるかのごとく振舞う（図１）。この細胞外[$K^+$]依存性は生理的に重要な性質であり、血漿[$K^+$]が多少増加してもこの性質によって電流の逆転電位である $E_K$ のプラス側の電位では必ず外向き電流が生じて静止電位は $E_K$ に向かって導かれる。

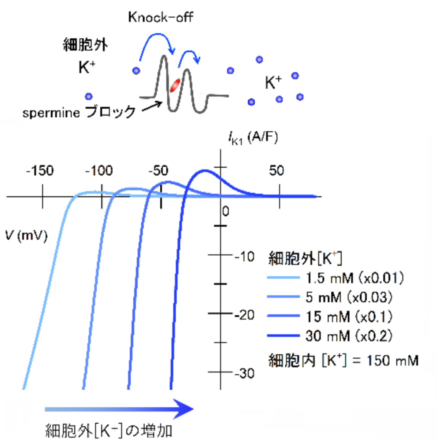


図１　内向き整流性$K^+$チャネルの電流ー電圧関係の細胞外[$K^-$]依存性

そのメカニズムは古くから、細胞外から選択的にチャネルに進入する $K^+$が細胞内から進入する正電荷を帯びたブロッカーと競合するために細胞外[$K^+$]の増加／減少がブロックの減少／増加をまねくというスキームで説明されてきた（細胞外 $K^+$による knock-off 機構；図１挿入図）（Hille, J Gen Physiol, 1978; Armstrong, Membranes, 1975）。背景には古典的な実験では内向き整流性の電位依存性は細胞内[$K^+$]の変化によって移動しないと結論され、内向き整流性は膜電位と細胞外[$K^+$]の２つに依存すると考えられてきたことがある。しかし今日では内向き整流性は 2～4 価の多様な細胞内陽イオンによるブロックで生じることが示されており、細胞外から進入する一価の $K^+$との競合によってそれらのブロックの電位依存性がすべて $E_K$ に依存して変化する必然性を説明するのは難しい。

内向き整流性 $K^+$チャネルにはこの他にその透過性（コンダクタンス）が細胞外[$K^+$]（の平方根）に比例して増大するという重要な性質があり（図１）、最近われわれは細胞外に存在する不透過の $Na^+$によるブロックが $K^+$透過と競合するためにこれが生じることを見出した（Ishihara, J Gen Physiol, 2018）。そこで本研究では内向き整流性のメカニズムを、チャネルを透過する $K^+$との関連において解明する目的で、細胞内の $K^+$と不透過の陽イオンの相互作用についてあらためて詳細に検討することにした。

## ２．研究の目的

古典的な研究において内向き整流性 $K^+$チャネルが示す内向き整流性と膜電位の関係（電流—電圧関係）は細胞内[$K^+$]を増減させても $E_K$ の変化に連動して電位軸上を移動するこは無いとされ（Hagiwara & Yoshii, J Physiol 1979；Hestrin, J Physiol 1981）、その後にこの真偽を明らかにした研究成果はない。今日では生理的な内向き整流性は細胞内のポリアミンによる電位依存性のブロックによるものと理解されているが、ポリアミンによるブロックと細胞内[$K^+$]との関係はこれまで明確にされていない。われわれは細胞外[$K^+$]を 150 mM から 5.4 mM までの間で変化させた場合はポリアミンによるブロックは常に膜電位と $E_K$ の差（$K^+$に対する駆動力）に正確に依存することをすでに確認している（Ishihara & Yan, J Physiol, 2007）。この結果はブロックが膜電位と細胞外[$K^+$]に依存するという従来の考え方では不十分であり、膜電位と細胞内外の[$K^+$]勾配（$K^+$の電気化学ポテンシャル勾配）に依存することを強く示唆している。そこで本研究ではあらためて細胞内ポリアミンによるブロックの電位依存性と細胞内[$K^+$] との関係を明らかにすることを目的として実験を行った。

## ３．研究の方法

標準的な内向き整流性 $K^+$チャネルである Kir2.1（IRK1）をヒト胎児腎細胞株 293 (HEK293) に発現させ、径が 1~2 um のパッチ電極先端に細胞質（細胞内）側が外を向くように密着させた細胞膜小片（インサイドアウト・パッチ膜）からパッチクランプ法による膜電位固定下に巨視的な Kir2.1 電流を記録して細胞内陽イオンの効果を解析した。

## ４．研究成果

(1) 本研究ではスペルミンによるブロックで生じる Kir2.1 の内向き整流性に対して細胞内[$K^+$]が与える影響を調べた。先ず先行研究と同様に細胞質（細胞内）液の $K^+$を $Na^+$に置換して細胞内[$K^+$]を減少させると、ブロックの電位依存性は電位軸上を $E_K$ の変化に連動して移動することは無く、一方で内向き整流性の電位依存性の強さが緩やかなものへ変化するという結果が再現された。しかし細胞内[$K^+$]を変えずに $Na^+$を加えただけでも内向き整流性の電位依存性は緩やかなものへと変化したことから、この結果には細胞内の $K^+$を $Na^+$に置換したために生じる細胞内 $Na^+$によるブロックが重なっている可能性が強く示唆された。

(2) 細胞内の $K^+$を置換する目的で加えた $Na^+$が内向き整流性を引き起こすかどうかについて、ポリアミンを含まない細胞質液を用いて調べたところ、直線的な電流—電圧関係の傾き（コンダクタンス）は $K^+$を他の陽イオンに置換しなければ[$K^+$]を減少させてもほとんど変化しなかったが、$K^+$を $Na^+$に置換すると電流—電圧関係は広い電位域に及ぶ緩やかな内向き整流性を示すようになることが確認された。さらにこの内向き整流性を示す電流—電圧関係は細胞内[$K^+$]が減少すると $E_K$ の変化とは逆の負電位側へと移動し、細胞内[$K^+$]の減少によって $Na^+$によるブロックが強くなることが示された。

(3) そこで改めて細胞内 $K^+$を置換することなく [$K^+$]を段階的に減らして、スペルミンによるブロックの電位依存性（電流—電圧関係）の変化を調べたところ、スペルミンが引きおこす急峻な強い内向き整流性は細胞内[$K^+$]の減少とともに電位軸上を $E_K$ が変化する正電位側へと移動することが示された。

しかしその移動幅は[$K^+$]が減少するほど $E_K$ の変化幅よりも小さくなり、同時に電流トレースにみられる外向き電流抑制の時間経過が次第に速くなった。これは $K^+$を置換せずに[$K^+$]を減少させたために細胞質液のイオン強度が減少してスペルミンの実効濃度が増加したことによる影響によって説明可能であった。

そこでスペルミン濃度の影響を受けない、ブロックが開放される時間経過を反映する内向き電流活性化の時定数を解析したところ、時定数の電位依存性は細胞内[$K^+$]を減少させると $E_K$ の変化に一致して移動することが示された。

(4) 細胞内 $K^+$を $Na^+$に置換した細胞質液にスペルミンを添加した場合にも、スペルミンによって生じる急峻な強い内向き整流性の電位依存性は細胞内[$K^+$]の減少とともに電位軸上を $E_K$ が変化する正電位側へ向かって移動した。

しかし $K^+$を $Na^+$に置換することでイオン強度が保たれているにも拘らず、移動幅は [$K^+$]減少（$Na^+$増加）にしたがって $E_K$ の変化幅よりも小さくなり、同時に内向き電流活性化の時定数の電位依存性の移動幅も $E_K$ の変化幅より小さくなることが示された。

(5) 以上の結果から、①細胞内 $Na^+$は内向き整流性 $K^+$チャネルを緩やかな電位依存性をもってブロックし、このブロックは細胞内 $K^+$と競合する、②他の陽イオンによるブロックを排除する目的で細胞内 $K^+$を置換せずに細胞内[$K^+$] を変えると、スペルミンによるブロックが引き起こす急峻で強い内向き整流性の電位依存性は $E_K$ に連動して電位軸上を移動する、③細胞内 $K^+$を $Na^+$に置換した場合にもスペルミンによるブロックの電位依存性は $E_K$ の変化の方向に向かって移動するが、その移動幅は $E_K$ の変化幅よりも小さく、これは $Na^+$の作用によってスペルミンによるブロックの開放が起こり難くなるためである、などのことが示された。

(6) 本研究結果は内向き整流性 $K^+$チャネルの強い内向き整流性を引き起こすポリアミンによる電位依存性ブロックは細胞内外の[$K^+$]勾配と電位差で決まる $K^+$の電気化学ポテンシャル勾配、すなわち、$K^+$の移動を駆動する力に依存することを示すと考えられる。したがってそのメカニズムは従来の、膜電位で駆動される不透過の細胞内イオンによるブロックが細胞外からチャネルに選択的に進入する $K^+$との競合（knock-off）によって制御されるというスキームでは不十分であり、細胞内からチャネルに進入する $K^+$によってブロッカーが押し込まれる knock-on タイプの機構でブロックが駆動されるか、もしくはブロックが細胞内からの $K^+$によって安定化される lock-in 機構を考える必要性が示唆される（図２）。

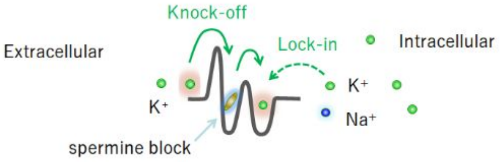

図２　細胞内K+によるスペルミン・ブロックのlock-in機構

細胞内 $Na^+$は、スペルミンによるブロックを $K^+$が knock-on あるいは lock-in する際に作用するチャネル部位で $K^+$と競合してチャネルをブロックするのではないか、またポリアミンによるブロックの開放はこの部位に $Na^+$が存在すると妨げられるのではないかと推察された。

＜引用文献＞


① Hille, Schwarz. Potassium channels as multi-ion single-file pores. J Gen Physiol, 1978.
② Armstrong. Potassium pores of nerve and muscle membranes. Membranes, 1975.
③ Ishihara. External $K^+$ dependence of strong inward rectifier $K^+$ channel conductance is caused not by $K^+$ but by competitive pore blockade by external $Na^+$. J Gen Physiol, 2018.
④ Hagiwara, Yoshii. Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg as examined by internal perfusion. J Physiol, 1979.
⑤ Hestrin. The interaction of potassium with the activation of anomalous rectification in frog muscle membrane. J Physiol, 1981.
⑥ Ishihara, Yan. Low affinity spermine block mediating Low-affinity spermine block mediating outward currents through Kir2.1 and Kir2.2 inward rectifier potassium channels. J Physiol, 2007.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　1件）

| １．著者名 | ４．巻 |
| --- | --- |
| Keiko Ishihara | 150 |
| ２．論文標題<br>External K+ dependence of strong inward rectifier K+ channel conductance is caused not by K+ but by competitive pore blockade by external Na+ | ５．発行年<br>2018年 |
| ３．雑誌名<br>Journal of General Physiology | ６．最初と最後の頁<br>977-989 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1085/jgp.201711936 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著<br>該当する |

〔学会発表〕　計11件（うち招待講演　3件／うち国際学会　2件）

| １．発表者名 |
| --- |
| 柳（石原）　圭子 |
| ２．発表標題<br>“Knock-off” and “lock-in” of the polyamine block by K+ ions determine the position along the voltage axis of the current-voltage relationship of the Kir2.1 inward rectifier |
| ３．学会等名<br>The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan |
| ４．発表年<br>2020年 |

| １．発表者名 |
| --- |
| 柳（石原）　圭子 |
| ２．発表標題<br>心筋内向き整流性カリウム電流IK1の分子機構 |
| ３．学会等名<br>日本ポリアミン学会 第11回年会（招待講演） |
| ４．発表年<br>2020年 |

| １．発表者名 |
| --- |
| 柳（石原）　圭子 |
| ２．発表標題<br>Kir2.1 チャネル内向き整流性の細胞外 K+濃度依存性のメカニズム |
| ３．学会等名<br>生理学研究所 研究会2019「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム:構造生物学の先にあるもの」 |
| ４．発表年<br>2019年 |

１．発表者名
柳（石原）　圭子

２．発表標題
IK1(Kir2.1)チャネルの細胞外K+依存性の分子機構　（心電学フロンティア2019 K+チャネルのしくみ）

３．学会等名
第66回日本不整脈心電学会学術大会（招待講演）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Keiko Ishihara

２．発表標題
New insights into K+ dependences of the strong inward rectifier potassium channel Kir2.1

３．学会等名
第9回アジア・オセアニア生理学会連合2019年大会、第96回日本生理学会大会（合同大会）（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Keiko Ishihara

２．発表標題
New insights into basic properties of the strong inward rectifier K+ channel

３．学会等名
第49回生理研国際シンポジウム "Ion channels: looking back, seeing ahead"（招待講演）（国際学会）

４．発表年
2018年

１．発表者名
柳（石原）　圭子

２．発表標題
内向き整流カリウムチャネルのKイオン透過の制御機構

３．学会等名
平成29年度生理学研究所研究会「膜システムの機能的・構造的統合」

４．発表年
2017年

| |
|---|
| １．発表者名<br>Ishihara K, Matsuoka S, Takano M |
| ２．発表標題<br>Mechanisms for external K+ dependence of K+ permeation and gating of Kir2.1 inward rectifier K+ channel |
| ３．学会等名<br>The 94th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Symposium 12: Simulation studies of structures, dynamics, and functions of ion channels and transporters |
| ４．発表年<br>2017年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>柳（石原）圭子、鷹野誠 |
| ２．発表標題<br>Kir2.1チャネルの細胞外Kイオンに依存するKイオン透過のメカニズム |
| ３．学会等名<br>第67回西日本生理学会 |
| ４．発表年<br>2016年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>柳（石原）圭子、鷹野誠 |
| ２．発表標題<br>Kir2.1チャネルの細胞外K+に依存する透過と開閉のメカニズム |
| ３．学会等名<br>平成28年度生理学研究所研究会「膜システムの機能的・構造的統合」 |
| ４．発表年<br>2016年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>柳（石原）圭子、鷹野誠 |
| ２．発表標題<br>心筋内向き整流K+チャネルのK+透過は細胞外K+に依存するのか |
| ３．学会等名<br>生理学研究所 研究会2016「心臓・血管系の包括的な機能統合研究」 |
| ４．発表年<br>2016年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|