

平成22年 5月17日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17081012
 研究課題名（和文） K^{+} ・水輸送を担う機能的微小膜プラットフォームの同定と
 構成基盤の解析
 研究課題名（英文） Analyses of functional the micro-platform mediating
 K^{+} and water transport
 研究代表者
 日比野 浩 (HIBINO HIROSHI)
 大阪大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：70314317

研究成果の概要（和文）：脳のアストロサイトは、神経の活性化により増加する細胞外の K^{+} を取込み、血管の方向へ放出する K^{+} 緩衝を担う。また、浸透圧勾配に従い、共に水も運搬される。この K^{+} ・水輸送は、 K^{+} チャネル Kir4.1 と水チャネル AQP4 により行われ、両者は同じ膜上で共存する。本研究により、Kir4.1 と AQP4 は、各々、異なる脂質に基づいた微小膜プラットフォームに局在して機能することが判明した。また、これらのプラットフォームは近接しており、これが K^{+} と水の共役輸送に関わると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Brain astroglial cells uptake excess extracellular K^{+} , which is induced by neural activity, and excrete it to blood vessels. This unidirectional K^{+} -transport is called “ K^{+} -buffering” and accompanied with water movement. These two transports are respectively mediated by a K^{+} channel, Kir4.1, and a water channel, AQP4, both of which occur together on the same membrane domain of the astroglial cells. In this study, we have found that Kir4.1 and AQP4 are expressed and functioned at the different micro-platforms containing distinct types of lipids. Furthermore, certain population of these two platforms is localized at the close vicinity, which would be involved in the coupling between K^{+} and water transports across the astroglial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------|------------|
| 2005年度 | 4,800,000 | 0 | 4,800,000 |
| 2006年度 | 14,400,000 | 0 | 14,400,000 |
| 2007年度 | 9,600,000 | 0 | 9,600,000 |
| 2008年度 | 9,600,000 | 0 | 9,600,000 |
| 2009年度 | 9,600,000 | 0 | 9,600,000 |
| 総計 | 48,000,000 | 0 | 48,000,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：アストロサイト・ K^{+} チャネル・水チャネル・輸送体・微小ドメイン

1. 研究開始当初の背景
 組織や細胞を介したイオン・水の適切な運搬

は、正常な臓器機能を保つために不可欠である。脳では、シグナル伝達を担う神経細胞を

グリア細胞が強固に取り囲んでいる。その一種であるアストロサイトは、多くの突起により神経細胞のシナプスに接し、それを包囲すると共に、一方で“終足: endfeet”と呼ばれる突起を血管周囲や脳軟膜直下に延ばしている。アストロサイトは、それら突起を介して、神経細胞の興奮時に細胞外へ放出される K^+ を迅速に取込み、血管や脳室方向へ放出する機能を持つ。この K^+ の一方向性輸送は、“K⁺緩衝作用”と呼ばれ、神経の正常な活動に必須である。また、陽イオンである K^+ が輸送されると、電荷を打ち消すため陰イオンである Cl^- が共に移動する。その結果、細胞膜を介した浸透圧勾配が生じ、それに従って水が移動する。よって、アストロサイトを介して、水分子は K^+ と共にシナプス側から血管・脳室側へと運搬される。この水輸送は、正常な神経細胞機能の維持のみならず、脳容量や脳血流・脳脊髄液循環のホメオスタシスにも深く関わっている。

イオンや水分子が一方向性運搬されるには、それら小分子を選択的に輸送するチャネルやトランスポーター等の“輸送装置”が、決まった場所に局在し、機能的に共役しなければならない。申請者らの研究室などにより、現在までに、脳アストロサイトの K^+ 緩衝作用と水輸送を担う責任分子は、内向き整流性 K^+ チャネル Kir4.1・Kir5.1 と水チャネル AQP4 であり、それらはシナプス周囲の突起や血管周囲・脳軟膜直下の終足に配置され、そこで共存していることが明らかになった。これら「特定の膜ドメイン」へのチャネルの局在決定には、ある種の足場蛋白質が関わる可能性も見出された。しかし、アストロサイトにおいて、これらのイオン・水輸送を可能にする分子基盤や、 K^+ ・水の共役輸送を支えるメカニズムは、十分に明らかとなっていなかった。

2. 研究の目的

これらの疑問に答えるため、本課題では、アストロサイトの K^+ 緩衝の中心的チャネルである Kir4.1 と、水輸送の責任分子 AQP4 に焦点を当てて、解析を進めた。アストロサイトの各々の突起はマイクロメートルサイズであるが、 K^+ ・水輸送の共役関係を考慮すると、その膜上で多彩な輸送装置が漫然と分布している構図は否定的である。我々は、細胞膜上に更に小さい単位 - 恐らく“ナノスケール” - の特殊な“場”があり、そこでチャネルやトランスポーター等の“機能分子”がある法則に従い集積している「機能的 微小膜プラットフォーム」があるとの仮説を立て、共役輸送が立脚する輸送装置の空間配置とその分子基盤を同定することを目的とした。そのために、脂質を含有し、神経・上皮細胞で特定のシグナル分子を集積させている微小膜プラットフォーム「Detergent Resistant Microdomain of cell membrane (以下 DRM)」

に注目して研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 生化学的解析

DRM は、その名の通り、界面活性剤に不溶性の成分として生化学的に分離できる。我々は、界面活性剤である Triton-X で処理したマウスの脳を、超遠心法で 12 のフラクションに分離し、以前の報告に従って、その中で比重の比較的軽い 3 番目を DRM 分画、比重の重い 8-12 番目を non-DRM 分画として単離した。更に、その分画における Kir4.1・AQP4 の発現を、それぞれに対する特異抗体を用いてウエスタンブロッティング法で検討した。また、両チャネルを、培養細胞である HEK 細胞に強制発現し、同様の実験を行った。

(2) 機能解析

微小膜プラットフォームへのチャネルの局在とその機能との関係を検討するため、Kir4.1 のチャネル活性と AQP4 の水輸送能を検討する実験を行った。

一般に K^+ チャネルが機能すると、細胞外が低い K^+ 濃度の条件下において細胞は過分極し、高い K^+ 濃度を含む溶液に暴露されると逆に脱分極する。この性質を用いて、Kir4.1 に関しては、細胞の膜電位をモニターすることでその活性を評価した。細胞は Kir4.1 を強制発現させた HEK 細胞を用い、膜電位は膜電位感受性色素 DiBAC を用いて測定した。この色素は、細胞が脱分極すると蛍光を増強させる特徴がある。

AQP4 の水輸送能は、蛍光色素 calcein を用いて、光学的に測定した。この色素は、一端、細胞内に入ると、その分子数が増減しない。よって、細胞が膨張すれば蛍光は減弱する。細胞を低浸透圧溶液に暴露すると、細胞内に水が流入し、そのスピードは、AQP4 の活性に依存する。蛍光減弱のスピードを観察することで、AQP4 の水運搬活性を評価した。

以上の光学的実験は、共焦点顕微鏡を用いて行った。

(3) 組織学的解析

チャネルの微小局在を検討するため、免疫組織学的手法を用いた。Kir4.1 または AQP4 を強制発現させたラットの培養アストロサイトを、それぞれの特異抗体で処理し、蛍光ラベルされた 2 次抗体で可視化した。同様の実験を、マウスの脳標本でも行った。観察は、共焦点顕微鏡を用いて行った。

4. 研究成果

(1) DRM における Kir4.1・AQP4 の発現

Triton-X で処理した脳の標本から、DRM 分画、non-DRM 分画を抽出し、ウエスタンブロッティ

ング法にて、Kir4.1 と AQP4 の発現パターンを検討した (図 1)。

Kir4.1 は、DRM 分画、non-DRM 分画の両者に強い発現が認められた。一方で、AQP4 の分布は、DRM 分画に限局しており、non-DRM には殆ど発現が認められなかった。加えて、アストロサイトの Cl⁻ 輸送に深く関わる ClC-2 Cl⁻チャンネルは、Kir4.1 と同様に両分画に強い発現が観察された。以上より、脳の DRM には、アストロサイトの K⁺緩衝や水輸送を担う輸送装置である Kir4.1 と AQP4、ClC-2 が共発現していることが判明した。

Kir4.1 と AQP4 をそれぞれ HEK 細胞に強制発現した場合も、脳と同じ分布パターンが認められた。更に、コレステロール枯渇剤である MβCD で HEK 細胞を処理すると、Kir4.1 の DRM 局在は損なわれたが、一方で AQP4 は全くその分布パターンを変化させなかった。よって、Kir4.1 と AQP4 は微小膜プラットフォームである DRM に分布するが、前者は MβCD 感受性 DRM、後者は MβCD 非感受性 DRM という異なった分画に局在することが明らかとなった。

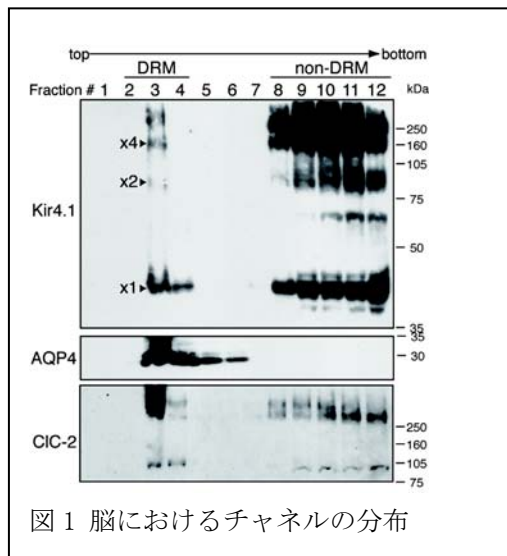


図 1 脳におけるチャンネルの分布

(2) DRM 局在の生理的意義

次に、チャンネルの DRM 局在の生理的意義について検討を行った。

Kir4.1 を発現した HEK 細胞を低 K⁺濃度の細胞外液に浸すと、細胞が過分極しているため DiBAC の蛍光は僅かであり、そこに高 K⁺濃度の溶液を還流すると、細胞は脱分極して蛍光は大きく増加した。細胞を MβCD で処理すると、その蛍光の大きな変化は、ほぼ完全に失われた。

AQP4 の水輸送に関しては、AQP4 を HEK 細胞に導入すると、低浸透圧依存性の calcein の蛍光減少が、通常の細胞の場合と比較して、劇的に加速することを確認した。この AQP4 を介した水輸送能は、MβCD によ

て細胞を処理しても、殆ど変化しなかった。

以上より、Kir4.1 と AQP4 の機能的なポピュレーションは、それぞれ MβCD 依存性・MβCD 非依存性の DRM に存在していることが強く示唆された。

(3) Kir4.1 と AQP4 の細胞膜上の分布

更に、細胞膜上で Kir4.1 と AQP4 を発現する微小膜プラットフォームが、どのような位置関係にあるかを、免疫組織学的に検討した。

まず、両チャンネルを共発現させた培養アストロサイトを用いた。Kir4.1 の免疫活性は磨りガラス状のパターンを呈したが、AQP4 の免疫活性は数百ナノメートルの島状の集積体として認められた。両者のオーバーラップは、殆ど認められなかった。次に機能的な Kir4.1 のみを観察するため、細胞を MβCD で処理し、同様の実験を行った。Kir4.1 の免疫活性も AQP4 と似た集積体として観察されたが、やはり両者の免疫活性は重なっていなかった。

更に、マウス脳のスライス標本において、Kir4.1 と AQP4 の分布パターンを、免疫組織学的に解析した (図 2)。脳では、Kir4.1 も AQP4 も数百ナノメートルの集積体として観察されたが、やはりそれらが重なる像は認められなかった。しかし、両者の一部は、互いに隣り合って非常に近い場所に配置されていることが明らかとなった (図 2B)。

以上から、脳アストロサイトにおいては、機能的な Kir4.1 と AQP4 は MβCD 感受性・MβCD 非感受性 DRM という異なった微小膜プラットフォームに分布していることが示された。また、この 2 つのプラットフォームの近接が、K⁺と水の共役輸送の基盤となっている可能性が示唆された。

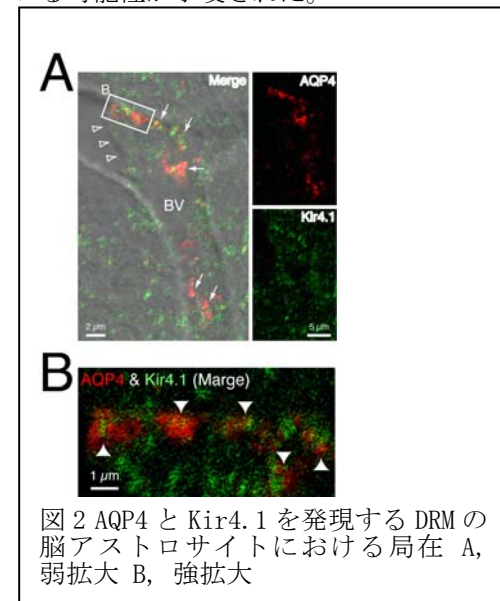


図 2 AQP4 と Kir4.1 を発現する DRM の脳アストロサイトにおける局在 A, 弱拡大 B, 強拡大

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18件)

1 Hibino H, Inanobe A, Furutani K, Murakami S, Findlay I, Kurachi Y. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol Rev.* 90(1):291-366, 2010.

2 Hibino H, Nin F, Tsuzuki C, Kurachi Y. How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflugers Arch.* 459(4):521-533, 2010.

3 Furutani K, Ohno Y, Inanobe A, Hibino H, Kurachi Y. Mutational and in silico analyses for antidepressant block of astroglial inward-rectifier Kir4.1 channel. *Mol Pharmacol.* 75(6):1287-95, 2009.

4 Hasegawa Y, Kanai Y, Hasegawa S, Okamoto T, Matsui T, Shimosegawa E, Kurachi Y, Hatazawa J. Evaluation of brain and whole-body pharmacokinetics of ¹¹C-labeled diphenylhydantoin in rats by means of planar positron imaging system. *Ann Nucl Med.* 22(4):301-307, 2008.

5 Lachheb S, Cluzeaud F, Bens M, Genete M, Hibino H, Lourdel S, Kurachi Y, Vandewalle A, Teulon J, Paulais M. Kir4.1/Kir5.1 channel forms the major K⁺ channel in the basolateral membrane of mouse renal collecting duct principal cells. *Am J Physiol; Renal Physiol.* 294:F1398-F1407, 2008.

6 [§]Nin F, [§]Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. The endocochlear potential depends on two K⁺ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:1751-1756, 2008. [§]equal contribution.

7 Hibino H, Kurachi Y. Distinct detergent-resistant membrane microdomains (lipid rafts) respectively harvest K⁺ and water transport systems in brain astroglia. *Eur J Neurosci.* 26:2539-2555, 2008.

8 Ohno Y, Hibino H, Lossin C, Inanobe A, Kurachi Y. Inhibition of astroglial Kir4.1 channels by selective serotonin

reuptake inhibitors. *Brain Res.* 1178:44-51, 2007.

9 Huang C, Sindic A, Hill CE, Huger KM, Chan KW, Sassen M, Wu Z, Kurachi Y, Nielsen S, Romero MF, Miller RT. Interaction of the Ca²⁺-sensing receptor with the inwardly rectifying potassium channels Kir4.1 and Kir4.2 results in inhibition of channel function. *Am J Physiol Renal Physiol.* 292:F1073-1081, 2007.

10 Nakamura T, Tanida M, Niijima A, Hibino H, Shen J, Nagai K. Auditory stimulation affects renal sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. *Neurosci Lett.* 416:107-112, 2007.

11 Osanai M, Takeno Y, Yagi T. Propagation of the excitatory signal in the neural network of the visual cortex recorded with the multielectrode array. *J Physiol Sci.* 57 (Suppl.): S150, 2007.

12 Su S, Ohno Y, Lossin C, Hibino H, Inanobe A, Kurachi Y. Inhibition of astroglial inwardly rectifying Kir4.1 channels by a tricyclic antidepressant, nortriptyline. *J Pharmacol Exp Ther.* 320: 573-580, 2006.

13 Shibata T, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. Gastric type H⁺,K⁺-ATPase in the cochlear lateral wall is critically involved in formation of the endocochlear potential. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291:C1038-1048, 2006.

14 Osanai M, Yamada N, Yagi T. Long-lasting spontaneous calcium transients in the striatal cells. *Neurosci Lett.* 402:81-85, 2006.

15 Kikuta J, Ishii M, Kishimoto K, Kurachi Y. Carvedilol blocks cardiac K_{ATP} and K_G but not I_{K1} channels by acting at the bundle-crossing regions. *Eur J Pharmacol.* 529:47-54, 2006.

16 Hibino H, Kurachi Y. Molecular and physiological bases of the K⁺ circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda).* 21:336-345, 2006.

17 Sawada K, Morishige K, Hashimoto K, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y, Kurachi Y. Gestational change of K⁺ channel opener effect is correlated with the expression of uterine K_{ATP} channel subunits. *Eur J*

Obstet Gynecol Reprod Biol. 122: 49-56, 2005.

18 Doi K, Sato T, Kuramasu T, Hibino H, Kitahara T, Horii A, Matsuhiro N, Fuse Y, Kubo T. Ménière's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, KCNE1 and KCNE3. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 67(5):289-293, 2005.

[学会発表] (計 15 件)

1 日比野 浩 脳アストロサイトに於ける K^+ ・水輸送の微小膜プラットフォームの解析 招待講演: 特定領域研究「生体膜トランスポートソームの分子機構と生理機能」平成 21 年度第 2 回班会議・公開シンポジウム 2010 年 3 月 19 日 (金) ~ 20 日 (土)、発表 20 日 (土)、大阪大学銀杏会館

2 古谷 和春, 大野 行弘, 稲野辺厚, 日比野 浩, 倉智 嘉久. Mutational and in silico analyses for antidepressant block of astroglial inward-rectifier Kir4.1 channel (グリア細胞に発現する内向き整流性 K^+ チャンネル Kir4.1 と薬物相互作用の双方向性解析). ポスター発表 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日 (水) ~ 18 日 (金)、発表 16 日 (水) 名古屋国際会議場

3 Murakami S, Hibino H, Kurachi Y. Functional basis underlying K^+ and water transports in astroglial cells and their reconstitution by computer simulation. Poster presentation 1st Joint Workshop on Computational Science. 2008 年 7 月 7 日 (月) ~ 8 日 (火)、発表 7 日 (月) 理化学研究所、和光研究所

4 大野 行弘, 古谷 和春, 稲野辺厚, 日比野 浩, 倉智 嘉久. Fluoxetine によるアストログリア Kir4.1 チャンネル阻害の分子メカニズム Poster presentation 第 128 回日本薬学会 2008 年 3 月 26 日 (水) ~ 28 日 (金) 発表 27 日 (木) パシフィコ横浜

5 日比野 浩, 倉智 嘉久. 脳グリア細胞の K^+ ・水輸送を担う膜マイクロドメインの同定と解析. Symposium 特定領域研究 公開シンポジウム「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」2008 年 3 月 22 日 (土) 東京大学理学部小柴ホール

6 古谷 和春, 大野 行弘, 日比野 浩, 稲野辺厚, 倉智 嘉久. 抗鬱薬は Kir4.1 チャンネルの central cavity に結合

しその機能を阻害する. Poster presentation 第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 (月) ~ 19 日 (水) 発表 17 日 (月) パシフィコ横浜

7 大野 行弘, 古谷 和春, 稲野辺厚, 日比野 浩, 倉智 嘉久. 抗うつ薬による Kir4.1 チャンネル阻害の分子メカニズム. Poster presentation 第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 (月) ~ 19 日 (水) 発表 17 日 (月) パシフィコ横浜

8 日比野 浩, 倉智 嘉久. 脳アストロサイトの K^+ ・水輸送を担う微小膜ドメインとその生理機能. Symposium 第 81 回日本薬理学会年会 2008 年 3 月 17 日 (月) ~ 19 日 (水) 発表 19 日 (水) パシフィコ横浜

9 日比野 浩, 大野 行弘, 稲野辺厚, 倉智 嘉久. 中枢神経・聴覚障害に対する新しい薬剤開発標的としての内向き整流性 K^+ チャンネル Kir4.1. Symposium 第 127 回日本薬学会 2007 年 3 月 28 日 (水) ~ 30 日 (金) 発表 29 日 (木) 富山県民会館

10 日比野 浩, 倉智 嘉久. 脳アストロサイトでは異なった界面活性剤不溶性マイクロドメインが K^+ ・水輸送を担う. Poster presentation 第 84 回日本生理学会大会 2007 年 3 月 20 日 (火) ~ 22 日 (木) 発表 22 日 (木) 大阪国際交流センター

11 大野 行弘, 稲野辺厚, 日比野 浩, 倉智 嘉久. 選択的セロトニン再取り込み阻害薬 fluoxetine によるアストロサイト内向き整流性 Kir4.1 チャンネルの抑制効果. Poster presentation 第 84 回日本生理学会大会 2007 年 3 月 20 日 (火) ~ 22 日 (木) 発表 22 日 (木) 大阪国際交流センター

12 日比野 浩, 倉智 嘉久. 脳アストロサイトにおいて K^+ ・水輸送を担う微小膜ドメインの同定と解析. Poster presentation 第 80 回日本薬理学会年会 2007 年 3 月 14 日 (水) ~ 16 日 (金) 発表 15 日 (木) 名古屋国際会議場

13 日比野 浩, 倉智 嘉久. グリア細胞の K^+ ・水輸送を担うチャンネルの局在制御とその分子基盤. 特定領域研究 公開シンポジウム「生体膜トランスポートソームの分子構築と生理機能」2006 年 3 月 25 日 (土) 東京大学薬学部講堂

14 日比野 浩, 倉智 嘉久. グリア細胞の K^+ ・水輸送を担うチャンネルの局在制御とその分子基盤. Symposium 第 83 回日本生理学会大会 2006 年 3 月 28 日

(火)～30日(木) 発表28日(火) 群馬県民会館

15 日比野 浩, 都築 千鶴, 中尾寛美, 倉智 嘉久. 脳アストロサイトにおける K^+ ・水輸送を担う微小膜プラットフォームの同定. Poster presentation 第79回日本薬理学会年会 2006年3月8日(水)～10日(金) 発表9日(木) パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日比野 浩 (HIBINO HIROSHI)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：70314317

(2) 研究分担者

倉智 嘉久 (KURACHI YOSHIHISA)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：30142011

野村 泰伸 (NOMURA TAISHIN)
(2008年度～2009年度)
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号：50283734

八木 哲也 (YAGI TETSUYA)
(2005年度～2007年度)
大阪大学・工学研究科・教授
研究者番号：50183976

(3) 連携研究者 なし ()

研究者番号：