

平成22年 5月 7日現在

研究種目：若手研究 (B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790207  
研究課題名 (和文) 神経細胞における内向き整流性カリウムチャネルの位置制御機構の解明  
研究課題名 (英文) A study on the mechanism for the dynamic position control of neuronal inward rectifier potassium channels.  
研究代表者 古谷 和春 (FURUTANI KAZUHARU)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40452437

研究成果の概要 (和文)：Kir チャネルの位置を追跡できる解析手法を新たに開発して、Kir チャネルの細胞内動態が構成サブユニットの種類によって決まることを見出した。この研究成果は、Kir チャネルの位置がどのように制御され、神経細胞で不均一な分布を形成するのか理解する助けとなる。また、抗精神病薬や抗うつ薬など、臨床でも用いられている中枢神経作用薬の幾つかがグリア細胞に発現する Kir チャネルを抑制することを見出し、その相互作用の機構を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We have developed a imaging method with several fluorescent proteins, I successfully observed the intracellular dynamics of Kir channels in living cells. I provided the evidences that Kir subtypes that compose the channel dramatically determine the intracellular dynamics. This mechanism may underlie the position control of Kir channels. In this study, we also examined the direct effect of drugs that clinically used in the treatments for neural disorders on Kir channel function, we found that several drugs, such as a series of antidepressants or antipsychotics, inhibit glial Kir channel (Kir4.1 channel) function by binding with the central cavity of it's pore.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：カリウムチャネル、神経細胞、細胞膜興奮性、薬理学、生理学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 内向き整流性カリウムイオン (Kir) チャネルは、細胞一般の静止膜電位の制御や、興奮性細胞の発火パターンの決定に重要な役割を果たすイオンチャンネルであり、神経細胞やグリア細胞にも豊富に発現している。Kir2.x サブファミリーは常時活性型であり、細胞膜上の発現量の制御は膜の興奮性を制御するための非常に重要な機構であるはずだが、その位置制御機構に関しては現在まで十分研究が進んでいなかった。また近年、Kir3.x チャネルは神経活動によって膜上の発現量が制御されている報告がされたが、先行研究で行われた電気生理学的な解析では空間的な位置情報は得られない。神経細胞は特に複雑な形態をしており、それは神経細胞が果たす機能に密接に関連している。各種のKir チャネルが神経細胞、及びグリア細胞に不均一に分布していることが知られているが、そのような膜上の不均一性がどのように形成されているか、またその機構は制御を受けるのかは完全には理解されていない。

(2) Kir チャネルの位置制御機構の解明には色々なアプローチで迫ることができる。これまではKir チャネルに特異的に結合する抗体を用いた免疫組織学的解析や、細胞可溶化液の超遠心画分を用いた生化学的解析などにより調べられてきた。細胞体からの電流測定による電気生理学的解析でも膜上の機能的イオンチャンネル数に変化があれば計測することができる。しかしこれらの方法では生細胞で個々のKir チャネルがどのような速度でその位置を変えているかは理解することができない。蛍光顕微鏡を用い、蛍光で標識したKir チャネルの位置を経時的に観察することで、Kir チャネルの細胞内動態の解析が可能となる。

(3) 先行研究では神経活動が Kir チャネルの位置を制御することが報告されている。実証研究では神経活動を変化させる薬物が貴重な実験ツールとなるが、そこで用いた薬物が Kir チャネル機能を直接変える可能性がある。薬物の作用を十分理解しておくことが、得られた結果を正しく判断する為に重要である。

## 2. 研究の目的

(1) 内向き整流性カリウムチャネルの時空間ダイナミクスを解析する技術を開発し、この実験系を用いてKir チャネルの細胞内動態という未解決な問題の解決のために適用し、時間的・空間的コンテキストにおいて定量的な解析を目指す。将来的には、Kir チャネルの神経細胞内不均一分布の形成機構の解明を目指している。

(2) これまで研究代表者は、神経活動依存的な神経機能の制御機構を研究してきた。

(1) の位置制御機構の解析手法の解析が可能となった後に、Kir チャネルの細胞内動態の可視化解析の神経細胞 Kir チャネルの位置制御における神経活動の役割を解析することを視野に入れている。(1)の研究に平行して、基礎的な情報として、中枢神経作動薬が Kir チャネルに直接作用するか否かを解析する。

## 3. 研究の方法

(1) Kir チャネルの動態の解析

① 神経細胞に緑色蛍光蛋白質 (GFP) で標識した Kir チャネルを培養細胞に発現させ、任意の位置で蛍光分子を退色させ、その後の蛍光の回復を時系列的に計測する、Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) 法により細胞内 Kir チャネルの動態を計測する。

② Photoactivatable (PA) GFP で標識した Kir チャネルを細胞に発現させ、任意の位置に UV 光を照射し photo-activation を行ない、Kir チャネルの流動性を測定する。

(2) Kir チャネル電流をパッチクランプ法を用いて解析する。

## 4. 研究成果

(1) GFP 標識 Kir チャネルの蛍光強度変化、及び Kir チャネル電流を測定した。最長 60 分にわたり計測したが、いずれの実験でも経時的な変化は観察されなかった (図 1 は代表例として GFP-Kir2.1 での結果、ただし 20 分まで)。この結果は、細胞膜上の Kir チャネル数とその測定時間内で変動していないことを意味する。

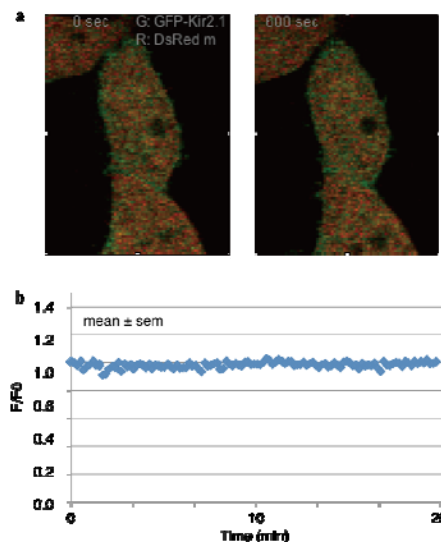


図 1. 細胞膜における GFP-Kir2.1 の蛍光シグナル強度の経時的変化は観察されない

a: HEK 細胞に mGFP-Kir2.1 (緑) と DsRed monomer (赤) を発現させて共焦点顕微鏡で観察 (左 0 分、右 10 分)。

b: mGFP-Kir2.1 の蛍光シグナルの経時的な測定 ( $n = 3$ , mean  $\pm$  sem)。

(2) FRAP 法により GFP-Kir チャンルの細胞膜上での動態の計測を試みたが SN 比が低く、実験方法の改善が必要だと分かった。そこで、PAGFP を用いた方法を考えた。紫外光の照射によって初めて活性化型となる蛍光蛋白質 PAGFP と Kir チャンルサブユニットの融合蛋白質 (PAGFP-Kirx.x) を作製し細胞に発現させた。UV 照射前はほとんど緑色蛍光を発しないが、ごく短い紫外光の照射 (~400 nm, 10-50 msec) によって、Kir チャンルを光標識することができた。この方法により、Kir チャンルの生細胞内動態の追跡が、FRAP 法よりも高い SN 比で可能となった (図 2)。ここで幾つか対照実験を行っている。チャンネルと結合していない PAGFP の膜直下での photo-activation では蛍光強度は一瞬のみ増加するが、ほんの数秒以内に UV 照射前の蛍光強度に戻ってしまうこと (我々の実験系では正確に測定できないがシグナル強度の減衰の時定数は 1 秒程度だと思われる)、PFA で固定した標本では、チャンネルに結合した PAGFP 及び結合していない PAGFP とも UV の照射によって著明な蛍光強度の増加、そしてその後数時間経っても蛍光強度が変化しないことを確認している。この二つの対照実験の結果は、細胞質に可溶性の分子 (GFP 蛋白質) の拡散速度が極めて早いことを意味している。そこで、Kir チャンルに結合させた PAGFP の観察を見てみると、まず UV 照射の直後に著明な蛍光強度の増加が、特に細胞膜部位に観察され、数分間にわたり、減衰していくのが分かる (図 2、及び図 3)。上述した対照実験での PAGFP シグナルの変化と比較すると、このタイムコースは Kir チャンルの細胞膜からの輸送を反映していると考えられた。

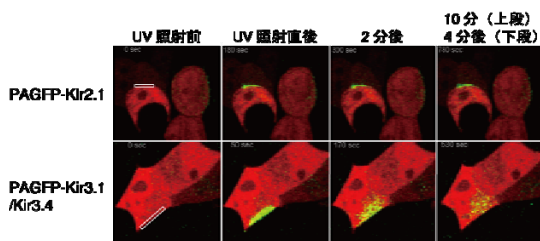


図 2. mPAGFP-Kir channel の蛍光シグナルの経時的変化  
HEK 細胞に mPAGFP-Kir2.1 (上段、緑) あるいは mPAGFP-Kir3.1/3.4 (下段、緑) と DsRed monomer (赤) を共発現させて共焦点顕微鏡で観察。測定開始後に白い囲いの位置 (最も左のパネル) に UV 照射。

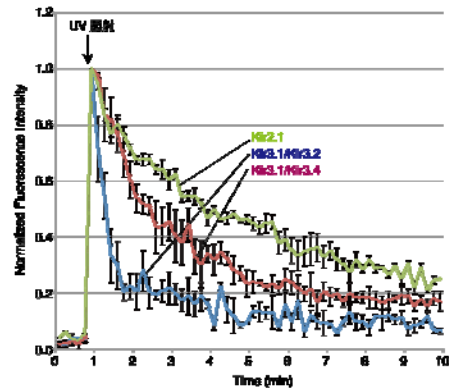


図 3. 細胞膜領域における mPAGFP-Kir channel の蛍光強度変化の経時的変化  
HEK 細胞に発現させた mPAGFP-Kir2.1 (黒ライン)、mPAGFP-Kir3.1/3.2 (青ライン) mPAGFP-Kir3.1/3.4 (赤ライン) の mPAGFP 蛍光強度変化。图中矢印で示した時間に細胞膜領域に UV を照射。UV 照射直後蛍光強度を計測。照射直後の蛍光強度で標準化している。(n = 3-4, mean ± sem)

(3) PAGFP を結合させた各種 Kir チャンルの膜からの輸送のタイムコースをサブユニット毎に比較した。図 2 上段では PAGFP-Kir2.1 の蛍光強度が変化する様子の典型例を示した。PAGFP-Kir2.1 の蛍光は UV 照射直後にピークに達し、その後数分間にわたりゆっくりと減衰していく。確認として、固定標本では活性化された PAGFP-Kir2.1 の蛍光強度がやはり長時間不変であることを見ている。従って、Kir2.1 チャンルは比較的ゆっくりと膜から移動していくことが分かった。より詳細な細胞の観察により膜上の側方拡散は非常に限定的であり、主にエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていくものと考えられた。一方、G 蛋白質で活性化される  $K_v$  チャンルの分子実体である Kir3.x チャンルの観察では Kir2.1 とシグナルの変化の速度が大きく異なっていた (図 2 下段、及び図 3)。生理的に見られる KG チャンルは Kir3.x のヘテロ四量体であることが知られている。Kir3.1/Kir3.2 ヘテロチャンネルは非常に早く、Kir3.1/Kir3.4 ヘテロチャンネルでも Kir2.1 より早く蛍光強度が減少していることが分かった。このようにサブユニット毎に細胞膜への保持時間が計測されたこと、またサブユニット間に明らかな差があることは本研究が初めて見出した結果である。

(4) 研究結果 (1) でも記述したように、静止状態では、Kir チャンルの膜への発現量はどのサブユニットにおいても、一定の範囲内にコントロールされていることが予測される。また研究結果 (3) で記述したように、速度論的な差はあるものの、Kir チャンルは非常にダイナミックに細胞内に取り込まれていることが今回明らかとなった。膜上の発現量を保つ為に、何らかの機構による膜への挿入もダイナミックに起こっているはずである。実際 FRAP 法のより、非常に早い膜部

位の Kir チャンネルの入れ替わりも観察した。このような膜への挿入、膜からの取り込みのダイナミクスは Kir チャンネル質の分解や新規合成を待たずとも、動態を制御することで膜上の発現量を制御できることを示している。特に神経系の KG チャンネルだと考えられている Kir3.1/3.2 チャンネルが非常に早く移動している結果は興味深い。

(5) 神経細胞において、Kir チャンネルの分子可視化法による測定が可能か検討した。リン酸カルシウム法による発現プラスミドベクターの導入を試みたが、海馬分散培養神経細胞、あるいは海馬由来のアストログリア細胞で解析に十分な PAGFP シグナルを得ることは、今回はできなかった。さらに遺伝子導入方法を最適化することが必要であることが分かった。

(6) 中枢神経作用薬、酵素阻害薬などの神経科学分野の研究で汎用される薬物の Kir チャンネルに対する直接作用を電気生理学的に解析した。Kir チャンネル機能が三環系抗うつ薬であるノルトリプチリンやセロトニン選択的取り込み阻害薬であるフルオキセチン等、臨床で使用されている抗うつ薬や、ハロペリドールなどの抗精神病薬 (D2 受容体拮抗薬) によって直接阻害されることが明らかとなった。特に中枢神経系のアストログリア細胞に発現する Kir4.1 チャンネルが薬物に対する感受性が他の Kir チャンネルよりも高かった。本研究期間中に Kir チャンネルの薬理学的プロファイルを調べ、またその阻害作用に必須の薬物-チャンネル相互作用の分子機構を明らかにできた。検討した薬物はいずれも Kir チャンネルポア領域の central cavity と呼ばれる空間まで侵入し、チャンネル機能を阻害していると考えられた (図 4)。今後薬物は、制御された Kir チャンネル輸送機構の解析、機能的チャンネル発現量の評価に用いる重要なツールとなる。

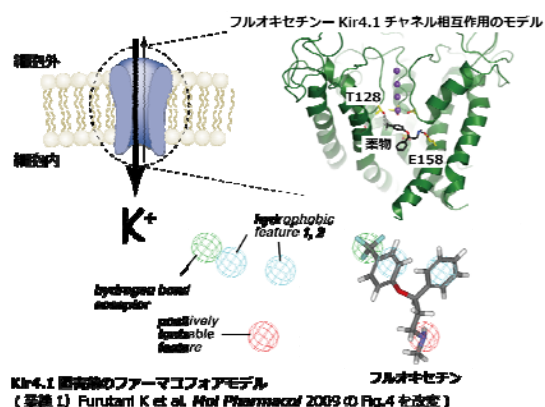


図 4 Kir チャンネル阻害薬のチャンネル機能阻害作用の構造的基礎

(7) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望

①本研究課題の成果として、これまで Kir チャンネルの位置制御機構の解析に欠如していた生細胞において経時的で定量的な解析を可能とする 1 つの方法論を初めて提供できた。これは非常に意義ある研究成果であると言える。同方法論を用いることで Kir チャンネルの細胞内動態の実体が明らかとなってきた。結果として、既にこれまで全く知られていなかったサブユニット間の輸送速度の違いが見えてきた。これは本研究で開発した方法論の有効性の高さを示す事例である。またこの方法論は神経細胞を含むあらゆる細胞に適用できる見込みがあり、Kir チャンネルの位置制御機構の解明に貢献すること大であると考えられる。つまり、Kir チャンネルの制御に関する知識の深化が期待される。神経細胞における Kir チャンネルの不均一な分布の形成機構の理解に留まらず、輸送機構の異常が原因で起こる病気が見出される可能性がある。

②臨床で使用されている種々の薬物が Kir チャンネルを阻害することを見出し、その分子機構を構造的に解析した。薬物の治療効果や、逆に副作用の発現に関与している可能性もある。実験科学のツールとして用いる場合にも、あるいは臨床で使用する場合にも理解しておくべき基礎的情報を提供できたと考えている。

## 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)

(1) Kazuharu Furutani, Yukihiro Ohno, Atsushi Inanobe, Hiroshi Hibino, Yoshihisa Kurachi. Mutational and *In Silico* Analyses for Antidepressant Block of Astroglial Inward-Rectifier Kir4.1 Channel. *Molecular Pharmacology*, 75(6), 1287-1295, 2009 (査読有り)

(2) Kazuharu Furutani, Atsushi Inanobe, Hiroshi Hibino, Yoshihisa Kurachi. Compound-induced block of ion channel pore function: inward-rectifier potassium channels as a model. *Molecular and Cellular Pharmacology* 1(5), 234-244, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 10 件)

(1) 古谷和春、大野行弘、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、内向き整流性 K<sup>+</sup>チャンネル Kir4.1 と薬物相互作用の双方向性解析、第 102 回近畿生理学談話会、2009 年 12 月 13 日、大

阪大学豊中キャンパス（大阪府）

(2) 古谷和春、大野行弘、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、内向き整流性  $K^+$ チャネルと薬物の相互作用の解析、第116回薬理学会近畿部会、2009年11月13日、ピアザ淡海（滋賀県立県民交流センター）（滋賀県）

(3) 古谷和春、大野行弘、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、グリア細胞に発現する内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir4.1 と薬物相互作用解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月24日、神戸ポートアイランド（神戸国際会議場、他）（兵庫県）

(4) 古谷和春、大野行弘、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、グリア細胞に発現する内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir4.1 と薬物相互作用の双方向性解析、第32回日本神経科学大会、2009年9月16日、名古屋国際会議場（愛知県）

(5) Kazuharu Furutani, Yukihiro Ohno, Atsushi Inanobe, Hiroshi Hibino, Yoshihisa Kurachi. Characterization of Intermolecular Forces for Antidepressants Block of Cerebral Glial  $K^+$  Channels at the Central Cavity of the Pore. 36th International Congress of Physiological Sciences. 2009年7月29日、国立京都国際会館（京都府）

(6) 古谷和春、大野行弘、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、グリア細胞に発現する内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir4.1 と薬物相互作用の双方向性解析、第115回薬理学会近畿部会 2009年6月26日、ホテル金沢（石川県）

(7) 古谷和春、倉智嘉久、グリア細胞に発現する内向き整流性  $K^+$ チャネル Kir4.1 と薬物相互作用解析、第295回CBI学会研究講演会、2009年4月3日、日本化学会化学会館（東京都）

(8) 古谷和春、稲野辺厚、倉智嘉久、Kirチャネル間の異なる薬物感受性の分子基盤、第82回日本薬理学会年会、2009年3月16日、パシフィコ横浜（神奈川県）

(9) Kazuharu Furutani, Atsushi Inanobe, Yoshihisa Kurachi. The Structural Basis for Antidepressants Block Being Confined to Kir4.1. 53th Annual Meeting of the Biophysical Society. 2009年3月3日 Boston Convention and Exhibition Center, Boston, MA.

(10) 古谷和春、大野行弘、稲野辺厚、日比野浩、倉智嘉久、グリア細胞に発現する内向

き整流性  $K^+$ チャネル Kir4.1 と薬物相互作用解析、生理学研究所研究会、2008年10月3日、岡崎コンファレンスセンター（愛知県）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

古谷 和春 (FURUTANI KAZUHARU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40452437

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：