

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791674

研究課題名（和文） 網膜における2孔型Kチャンネルの機能発現とその神経保護作用

研究課題名（英文） Two pore-domain potassium channel in retina: its functional expression and role of neuroprotection.

研究代表者

櫻田 規全 (SAKURADA NORIMASA)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80377390

研究成果の概要（和文）：ラット網膜において、2孔型KチャンネルのmRNA発現がみられ、組織学的に TRAAK と TREK-2 の発現が確認された。ただし、パッチクランプ法ではそのイオン電流は記録できなかった。一方、ブタ毛様体上皮では KCNQ チャンネル電流が記録された。毛様体では KCNQ 1, 4, 5 の mRNA が優位に発現していた。

研究成果の概要（英文）：The mRNA of two pore-domain potassium channel (K(2P)) was detected, and immunohistochemical findings showed TRAAK and TREK-2 expressions in the rat retina. However, patch-clamp study failed to detect K(2P) currents in isolated retinal cells. A KCNQ channel current was identified in porcine ciliary epithelial cells. Molecular biological analysis revealed that mRNAs of KCNQ1, 4 and 5 were expressed dominantly in ciliary body.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：眼科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：Kチャンネル、網膜、神経保護、ぶどう膜

## 1. 研究開始当初の背景

Kチャンネルには、6回膜貫通型である膜電位依存性、カルシウム依存性Kチャンネル、4回膜貫通型である2孔型Kチャンネル、2回膜貫通型である内向き整流Kチャンネルが知られている。6回膜貫通型、2回膜貫通型Kチャンネルはその生理学的作用についてよく解析されているが、2孔型Kチャンネルは、まだ解析が十分に進んでいるとは言えない。このチャンネルは2つのサブユニットが集合することにより機能的チャンネルが形成され、中枢神経や平滑筋など全身に幅広く分布し、細胞容積や膜電位に依存する機構を調節すると考えられている。

研究代表者は、これまで、角膜上皮のKチャンネルがアラキドン酸により著明に活性化されることを見出し、(Takahira M, Sakurada N, Segawa Y, Shirao Y. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 42(8):1847-54.)、それが2孔型Kチャンネルである TREK である可能性が高いことを電気生理学的に明らかにしてきた (Takahira M, Sakurai M, Sakurada N, Sugiyama K. Pflugers Arch. 2005 451(3):474-8.)。

2孔型Kチャンネルである TRAAK は網膜にも発現していることが明らかになっているが、mRNA レベルでの発現が確認されてものの、機能発現を調べた研究は少ない。また、2孔

型Kチャンネル活性化剤、Riluzole が網膜神経保護作用を呈する (Lazdunski Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999 40, 729-736.) ことから、網膜においてもこのチャンネルが機能的に発現しているのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、網膜における2孔型Kチャンネルの発現を、電気生理学的、生化学的、組織化学的に解析することを目的とした。また、ぶどう膜、特に毛様体は、房水を産生する組織であり、Kチャンネルが房水量の調節に関与している可能性がある。そこで、網膜やぶどう膜に発現しているKチャンネルの種類と局在を同定した。また、それらチャンネルの電気生理学的特性および薬理作用を明らかにし、緑内障における臨床応用の可能性を検証した。

## 3. 研究の方法

### 【RT-PCR】

ブラウンノルウェーラットの網膜、脳、ブタの網膜、網膜色素上皮、毛様体、虹彩より Illustra™ QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス)を用いて PolyA<sup>+</sup> RNA を抽出した。30ng の PolyA<sup>+</sup> RNA より、Gene Amp<sup>®</sup> RNA PCR Kit (アプライドバイオシステムズ)により RT-PCR を行った。2孔型KチャンネルおよびKCNQ1、KCNQ4のPCRには、AmpliTaq<sup>®</sup>の代わりに AmpliTaq Gold<sup>®</sup>を用いた。用いたプライマーの配列を表1、表2に示した。KCNQチャンネルmRNAの半

表1 2孔型Kチャンネルのプライマー配列

名称	配列(5' -3')
TASKF	TGGGCGCCGCGGTGTTCCG
TASKR	GCCCAGCACCGCATAGAACAT
TRAAKF	CTCAGTGCTCACCACCATCG
TRAAKR	GACTCGTCGATGAAGGCCAG
TREKF	GAATGTGAGTCAGACCAAGAT
TREKR	CTCAGGACAGCTGCAAAGTA

表2 KCNQチャンネルのPCRプライマー配列

名称	配列(5' -3')	予想される断片の長さ
hKCNQ1F	CAGCTGCGGGAACACCATCG	455bp
hKCNQ1R	CTGGGCAGGAAGAGCTCAGG	
hKCNQ2F	GACCCAGCATGATGGGACG	245bp
hKCNQ2R	CCCGTGGAGCTGCTGGAGCG	
hKCNQ3F	GCCAAAACACAAGAAGTCTCAG	370bp
hKCNQ3R	CACCTGGTGAAGCTGTAGG	
hKCNQ4F	TGGAGCTTCAATGACCGCAC	317bp
hKCNQ4R	CCCACAATTTGGTCCACCCG	
hKCNQ5F	ATGATGAAAAGGATGCCAGTG	363bp
hKCNQ5R	CCAGCTTGGATTCTATGGAC	
rACTBF	CGTGAATTCCAGACTACCTCATGAAGATCCT	592bp
rACTBR	CGTGAATTCCGCCTAGAAAGCATTTCGCGGT	

定量では、β-アクチンを内部標準に用いて、PCRのサイクル数を30回(KCNQ1)、24回(KCNQ2)、26回(KCNQ3)、28回(KCNQ4、KCNQ5)、20回(β-アクチン)で行った。増

幅された断片はアガロース電気泳動後、エチジウムブロマイド、またはSYBR<sup>®</sup> Green I (Cambrex Bio Science)により検出され、ダイレクトシーケンシング(DYEnamic™ ET Terminator、ABI PRISM™ 310 DNA Sequencer)により、塩基配列を確認した。

### 【免疫組織染色】

深麻酔下で、Brown-Norway ラットの眼球を取り出し、PBSでリンスした後、前眼部と後眼部に分割し、後眼部を4%パラホルムアルデヒド-りん酸緩衝液(和光純薬)中にて4℃で、4時間固定した。その後、10% sucrose 溶液(0.1M りん酸緩衝液、pH7.4)に1時間、20% sucrose 溶液に1時間、4℃で浸漬し、30% sucrose 溶液に、一晚浸漬した。クリオスタット(ブライト社製)中で、クリオモルド1号、O.C.T. コンパウンド(サクラファインテック)を用いて、組織を包埋し、14μmで薄切し、シランコートスライドガラスに伸展後、免疫組織染色に用いた。抗K2P4.1 (TRAAK)抗体(Applied Biological Materials社)は1/200、抗KCNK10 (TREK-2)抗体(Sigma-Aldrich)は1/750の濃度で、2次抗体としては、FITC 標識の抗ウサギ IgG (ダコ)抗体 1/40 濃度で反応させた。VECTASHIELD マウンティング溶液(Vector社)を滴下し封入し、蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE300, ニコン)下で観察した。

### 【パッチクランプ法によるイオンチャンネル電流記録】

ラット網膜組織を切り出し、パパイン含有細胞分離用溶液にインキュベートし、網膜神経細胞を単離した。顕微鏡下で、神経節細胞体と判断される細胞を選択して、電流記録の標的とした。また、同様にブタぶどう膜組織を切り出し、パパイン含有細胞分離用溶液にて、毛様体上皮細胞を単離した。単離細胞は、倒立位相差顕微鏡に設置したチェンバー内で灌流された。細胞外を灌流する標準リングル液組成は、135mM NaCl、5mM KCl、10mM HEPES、10mM グルコース、1.8mM CaCl<sub>2</sub>、1mM MgCl<sub>2</sub>、標準のピペット内充填液は30mM KCl、100 mM K-グルコネート、5mM HEPES、10mM EGTA、0.5mM CaCl<sub>2</sub>、2mM MgCl<sub>2</sub>の組成を有した。アンホテリシンB穿孔パッチ法によりホールセル電流が記録された。パッチピペットの電位はパッチクランプ用アンプ HEKA EPC8 を介してコンピューターのソフトウェア-pClampにて制御された。

## 4. 研究成果

### 【2孔型KチャンネルのRT-PCR】

ラット網膜のRT-PCRにより、TASKは約290bp、TRAAKは約320bp、TREKは約280bpの断片が認められ(図1)、これらの塩基配列を解析した結果、TRAAK、TREK-1、

TREK-2、TASK-1、TASK-3 の配列が認められた。TASK (1、3)、TREK (1、2) に関しては、混合配列であったため、各々を特異的に検出できるプライマーを作成し、再度、RT-PCR を行い、塩基配列を確認した。

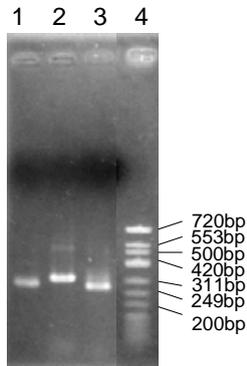


図1 2孔型KチャンネルのRT-PCR  
ラット網膜より抽出した poly(A)<sup>+</sup> RNA 30ng より RT-PCR を行った。TASK (lane 1)、TRAAK (lane 2)、TREK (lane 3)、ΦX174 HinfI マーカー (lane 4)。PCR サイクルは 35 回行い、増幅された断片は、アガロース電気泳動後、エチジウムブロマイドで検出された。

【2孔型Kチャンネルの免疫組織染色】

ラット網膜に TREK、TRAAK、TASK の mRNA の発現が認められたため、このうち、TRAAK と TREK-2 について、免疫組織染色を行った。その結果、TRAAK は神経節細胞の周り、内境界膜あたりに強いシグナルが見られ、外境界膜、外網状層、内網状層にもシグナルが認められた (図 2A、B)。TREK-2 は、外網状層に強くシグナルが認められ、内網状層、外境界膜にもシグナルが認められた (図 2C、D)。

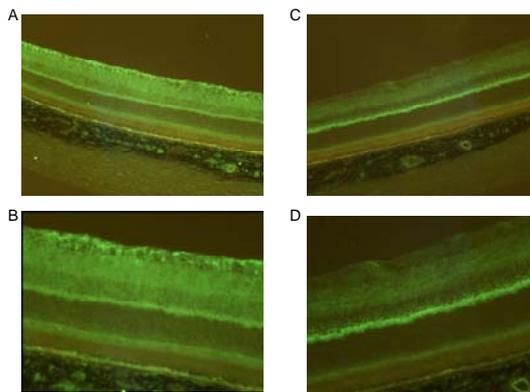


図2 網膜切片の抗 TRAAK、抗 TREK-2 抗体による免疫組織染色  
TRAAK、X100 (A)、X200 (B)、TREK-2、X100 (C)、X200 (D)

【ラット網膜細胞のイオンチャンネル電流】  
ラット網膜を酵素的に単離し、神経節細胞体

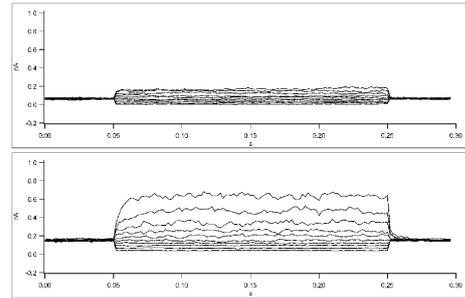


図3 ラット網膜細胞のホールセル電流  
脱分極保持でイオン電流は不活性化していたが (上)、フェナメートにより増大した (下)

と判断された細胞からパッチクランプ法にてホールセル電流を記録した。ほとんどの細胞では時間依存性のある電位開口型K電流が優位を占めていた。このK電流は、膜電位を脱分極すると不活性化された (図 3)。標的とする TREK あるいは TRAAK に由来する電流は、標準リングル灌流液下では機能発現していなかった。フェナメートにて電流の増大がみられた細胞もあったが (図 3)、アラキドン酸による活性化は生じなかった。すなわち、このフェナメート活性化電流は、C1 チャンネル由来である可能性が高い。結局、ラット網膜細胞においては、標準液下でも、アラキドン酸刺激下でも、2孔型Kチャンネルの機能発現は確認できなかった。実験の問題点は、単離した網膜細胞の種類が确实には同定できず、発現している電流から推察するしかないこと、また神経細胞であるので酵素単離によるダメージが否定できないこと、などが挙げられる。

【毛様体色素上皮細胞のKチャンネル】

ブタのぶどう膜から、毛様体上皮細胞を酵素的に単離し (図 4)、パッチクランプ法を用いて、イオンチャンネル電流を記録した。その結果、毛様体上皮細胞では報告のない新しいタイプのKチャンネルが発現していることが判明した。図 5 は代表的な毛様体上皮細胞のホールセル電流であり、時間依存性の外向き電流がみられた。膜電位を脱分極電位 (-10 mV) に保持しても、この電流は全く不活性化されない。電圧・コンダクタンス関係から、このチャンネルの開口閾値は、およそ -90m



図4 単離毛様体上皮細胞  
パッチピペットによりクランプ

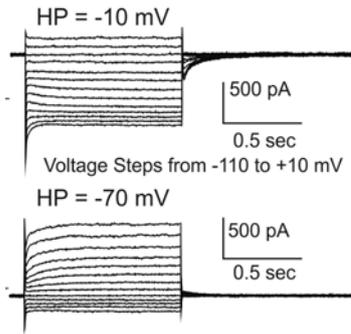


図5 毛様体上皮細胞のホールセル電流

V付近であった。このK電流は、KCNQチャンネルの特異的阻害剤 linopirdine で阻害された。また、細胞に低浸透圧負荷をかけるとこの電流は増大した。すなわち、細胞容量依存型イオンチャンネルである。古典的なKチャンネル阻害剤 Ba により、このK電流は阻害されたが、一方 TEA には感受性が低かった。このK電流は、網膜色素上皮M様電流に極めて類似し、以下のような共通する特徴が挙げられる。すなわち、1) 膜電位による不活性化がみられない、2) 開口閾値電位は-90mV付近にあり-10mV以上の電位でコンダクタンスは最大となる、3) 古典的K阻害剤の Baにより抑制されるが、TEAでは阻害されない。この毛様体色素上皮K電流が、特異的阻害剤 linopirdine で阻害されたことから、KCNQチャンネル由来であると考えられる。KCNQ 1～5のサブファミリーのうち、毛様体色素上皮K電流の薬理特性は、KCNQ 5に最も類似している。

#### 【ブタ眼組織における KCNQ チャンネルの RT-PCR】

ブタの KCNQ チャンネルの mRNA の塩基配列は、未知であるため、ヒト、ラット、マウスの既知の配列から相同性の高い領域を選び、それぞれのチャンネルのプライマーを作製した。ヒトの配列から推定すると、予想される断片の大きさは、455bp (KCNQ1)、245bp (KCNQ2)、370bp (KCNQ3)、317bp (KCNQ4)、363bp (KCNQ5) であると考えられた。実際の RT-PCR の結果は、ほぼ同じ大きさのバンドが、すべての KCNQ チャンネルで検出された。塩基配列を解析すると、ヒトとの相同性は、86.3% (KCNQ1)、87.3% (KCNQ2)、83.5% (KCNQ3)、92.4% (KCNQ4)、95.3% (KCNQ5) であり、ラットやマウスに比べて高い相同性があった。

相対的に見ると、KCNQ1、5は毛様体、虹彩に多く発現し、KCNQ2、3は網膜、脈絡膜に多く発現していた。KCNQ4は脈絡膜、毛様体、虹彩に多く発現していた(図6)。KCNQチャンネルのプライマーの配列は、ヒ

トの配列に一致しているため、単純には比較できないが、これらの組織における発現は、KCNQ1、4はラットの脳に比べて高かったが、KCNQ2、3は低かった。

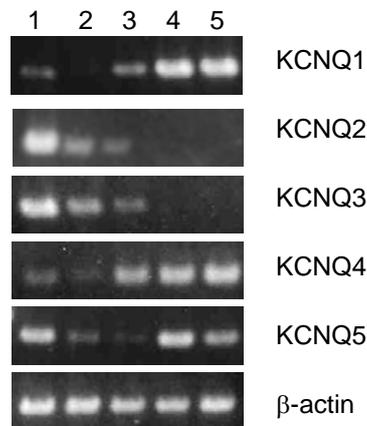


図6 ブタ眼組織における KCNQ チャンネルの半定量 RT-PCR

ラット脳 (lane1)、ブタ網膜 (lane 2)、脈絡膜 (lane 3)、毛様体 (lane 4)、虹彩 (lane 5) より抽出した poly(A)<sup>+</sup> RNA 30ng より RT-PCR を行った。PCR の反応サイクル数は、30回 (KCNQ1)、24回 (KCNQ2)、26回 (KCNQ3)、28回 (KCNQ4、KCNQ5)、20回 ( $\beta$ -actin) 増幅された断片はアガロース電気泳動後、SYBR Green Iにより検出された。

小腸上皮の分泌上皮には KCNQ チャンネルが発現し、イオン共輸送体を制御し水輸送にかかわっていることが知られている。毛様体上皮は2層の上皮が重なり、このKチャンネルは色素上皮においてイオンの能動輸送に関わる可能性がある。このチャンネルは浸透圧依存性であり、イオンの能動輸送の制御を介して水輸送に関わる可能性がある。すなわち、眼の房水産生を制御する薬理への応用が期待される。これら一連の結果は、目下、Investigative Ophthalmology & Visual Science 誌に投稿中である。

#### 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1件)

M Takahira, M Sakurai, N Sakurada, and K Sugiyama. Swelling-Activated Potassium Channel in Porcine Pigmented Ciliary Epithelial Cells. Investigative Ophthalmology & Visual Science 投稿中 (査読後改変中)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻田 規全 (SAKURADA NORIMASA)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：80377390

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし