

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590208

研究課題名（和文） 内向き整流 K チャンネルの生理機能を担うブロック低感受性コンダクタンスの分子機序

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of the physiologically relevant component of the inward rectifier potassium channels that shows low sensitivity to the channel blockers

研究代表者

柳 圭子（石原 圭子）(YANAGI KEIKO (ISHIHARA KEIKO))

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：70265990

研究成果の概要（和文）：

Kir2 内向き整流カリウム (K) チャンネルの外向き電流のわずかな電流振幅変化は神経細胞を介する情報伝達や筋細胞収縮など多彩な細胞機能を修飾する。本研究では Kir2 の外向き電流を運ぶ細胞内陽イオンブロック低感受性コンダクタンス成分の分子メカニズムを解明する目的でチャンネル機能の電気生理学的な検討を行った。その結果ブロック低感受性コンダクタンス成分は 1 分子陽イオンによるブロックがサブコンダクタンスレベルを誘発するというモデルでは説明されないことがわかり、早いキネティクスによって見かけ上単一チャンネルコンダクタンスが整流性を示すことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The outward currents of the Kir2 inward rectifier potassium (K) channels play an important role in regulating the functions of neuronal and muscle cells. We studied the molecular mechanisms of the Kir2 conductances that carry the outward currents by showing a low-sensitivity to the intracellular cationic blockers. Our study indicated that the low-affinity conductance cannot be explained by the sub-conductance levels induced by the blockers. It is suggested that the kinetics of the low-affinity blockage may be so fast that the unit conductances apparently rectify.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：心筋電気生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：内向き整流 K チャンネル、チャンネル開閉機構、電位依存性ブロック

1. 研究開始当初の背景

内向き整流カリウム (K) チャネルは膜電位を負に分極させる作用をもち、特に強い内向き整流性を示す Kir2 チャネルのわずかな外向き電流振幅変化は神経細胞を介する情報伝達や筋細胞収縮など多彩な細胞機能を修飾する。われわれはこれまでに Kir2 チャネルの外向き電流振幅を制御する細胞内イオン(ポリアミンや Mg イオン)による電位依存性ブロックについて巨視的電流記録を行い詳細な解析を行ってきた。その結果、逆転電位付近で大きく流れる外向き電流の大部分は細胞内陽イオンによるブロックに対する感受性が低い比較的小さなコンダクタンス成分を流れることを明らかにした (Ishihara & Ehara, J Physiol, 2004, Ishihara & Yan, J Physiol, 2007)。しかしこのブロック低感受性コンダクタンス成分の分子メカニズムは分かっていない。このチャネルコンダクタンスは特にポリアミン濃度の低い心筋細胞などでは活動電位の再分極に必要な外向き電流を静止電位付近に限局して運ぶ重要な役割を担う。したがってその分子メカニズムの解明は特に心臓電気生理学にとって重要な課題である。

2. 研究の目的

Kir2 チャネルの外向き電流は QT 延長症候群や心房細動などの心臓の不整脈に関連があり、また Kir2 チャネルは中枢神経系においても様々な病態との関連が示唆されている。Kir2 チャネルを特異的に抑制する薬剤として広く認知されたものはまだ開発されておらず、病態を解明するための研究のツールとして、さらには病態をコントロールするツールとしてその様な薬剤の開発が待たれている。本研究において着目する

チャネルコンダクタンス成分の分子機序を解明することはその突破口になる可能性があり意義があるものと考えた。

3. 研究の方法

(1) Kir2 チャネルの遺伝子を培養細胞株に発現させ、電気生理学的手法 (パッチクランプ法) によって巨視的電流および単一チャネル電流を記録して解析を行った。

(2) Kir2 チャネルを高密度に発現させた培養細胞の細胞膜を精製してこれを人工脂質二重膜に埋め込む方法の開発を行った。

4. 研究成果

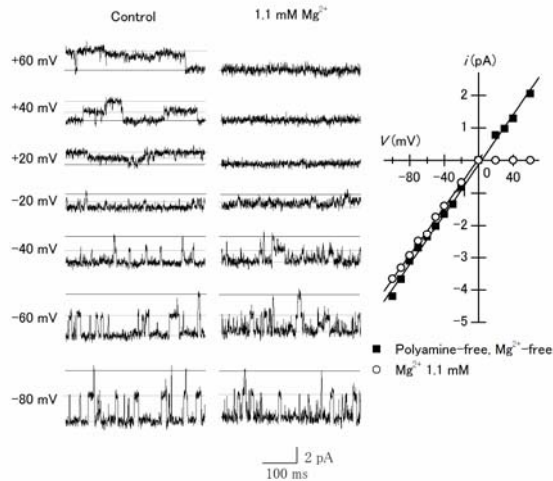
(1) 細胞内陽イオンによるブロック感受性が低い Kir2 チャネルコンダクタンスの機序の解明

われわれ及び他研究グループによる検討によってこれまでブロック低感受性コンダクタンス成分の分子メカニズムとしては

(1) チャネル構造にブロックに対する感受性が異なる 2 状態 (高感受性と低感受性) があるという 2-state model、(2) チャネルブロックには 2 分子の細胞内陽イオンが必要であり、1 分子目の高親和性ブロックは不完全なブロックを生じ、さらなる 2 分子目の低親和性ブロックによって完全ブロックに至るという 2-blocker model が提唱されてきた。本研究では単一チャネル記録によってこの 2 つのモデルの可能性を検討した。その結果、(1) 単一チャネル記録で細胞質側液に加えた Mg イオンやポリアミン (スperlミン) による Kir2 チャネルのブロックを観察したところ、巨視的電流記録で観察される高親和性ブロックを受けるコンダクタンス成分に相当するチャネルのみが記録され、外向き電流成分に期待され

るサブコンダクタンス成分が観察されることはなかった。(図1: Mgによる外向き電流抑制; 図2: スペルミンによる外向き電流抑制)。

<図1>



<図2>

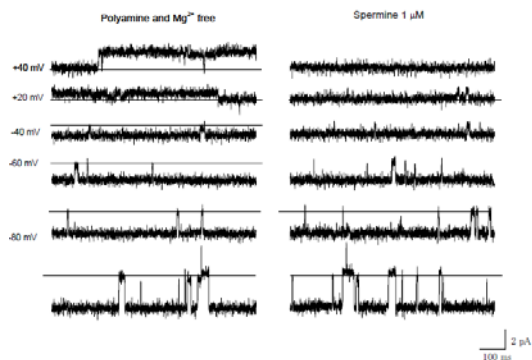


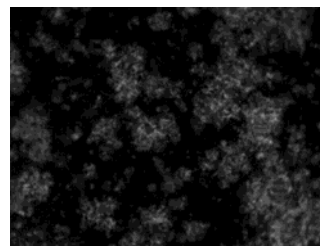
図2のデータにおいて 2-blocker model が正しいならば、スペルミン存在下において +20mV において開確率 80%、+40mV において開確率 30%のサブコンダクタンスレベル (10%レベル) が観察されることが期待されるがみられなかった。2-state model が正しいならば、チャンネル 10 個のうち 1 個の割合で、内向き電流と同じフルコンダクタンスレベルの外向きの単一チャンネル電流が +20mV において開確率 80%、+40mV において開確率 30%で開閉する様子が観察されなければならないが、このような現象もみられなかった。したがってブロ

ック低感受性チャンネルは 10 個のうち 1 個存在するが、ブロックの開閉キネティクスが非常に早く、見かけ上小さなリーク電流の様な電流を流すために単一チャンネル記録では観察されないのではないかと結論した。したがってわれわれは 2-state model は否定されないと考えた。この 2 状態は頻繁に移行するものではなく (単一チャンネル記録で基線の変化は観察されない)、また巨視的電流記録において細胞内 pH の酸性化によってその割合がそれほど変化しない事からチャンネル構造の内部かチャンネルと脂質との interaction に鍵があると考えられた。

(2) Kir2 チャンネルを高密度に発現させた培養細胞の細胞膜を精製してこれを人工脂質二重膜に埋め込む方法の開発

われわれは上記の結論に基づき、Kir2 チャンネルとこれが埋め込まれている細胞脂質膜との関係を検討すべく、Kir2 チャンネルを高密度に含む細胞膜を人工脂質膜に埋め込み、チャンネル電流を記録することを試みた。

<図3> 精製した膜分画



細胞内小器官を除く膜を精製する系を開発した。この方法を発展させて Kir 2 チャンネルタンパクと脂質との関連に着目してブロック感受性の違うチャンネル構造の解明へとつなげることが可能である。

(3) 酸性 pH 下で Kir2 チャンネルをブロック細胞内陽イオンの発見

われわれは新たに細胞内 pH が酸性化された際に陽イオンとなり Kir2 チャンネルを

電位依存性にブロックする分子が存在することを明らかにした(論文投稿中)。本分子は様々な病態で細胞内が酸性化された際に Kir2 電流を抑制すると考えられ、病態生理学的に重要な知見であると考えられる。

(4) 局所麻酔薬による Kir2 チャネル抑制機構

われわれは臨床的に神経細胞近傍に高濃度に投与される局所麻酔薬が Kir2 チャネルを抑制することを新たに見出した(論文投稿準備中)。この抑制メカニズムには Kir2 チャネルを含む細胞膜ベジクルの輸送が関係していることがわかった。

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)

- ① 石原圭子. Mg の電気生理学. 日本心電学会誌心電図. 2013 (印刷中)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 中平圭、坂口 嘉郎、石原圭子. 局所麻酔薬リドカインとブピバカインによる Kir2. x 内向き整流 K チャネル抑制機構. 日本麻酔科学会 第 60 回学術集会. 2013 年 05 月 23 日、北海道
- ② Nakahira K, Fujisawa A, Ishihara K. Inhibition of Kir2.x inward rectifier K⁺ channels by local anesthetics, bupivacaine and lidocaine. The 90 th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2013 年 03 月 28 日. Tokyo
- ③ 石原圭子. Mg の電気生理学. 心電学フロンティア 2012 「炎症と不整脈・Mg の多彩な心筋作用」 第 29 回」日本心電学会学術集会(招待講演) 2012 年 10 月 12 日、千葉
- ④ Ishihara K. Low affinity polyamine block of I_{K1} facilitating the cardiac repolarization. Special Symposium “Ion channels, Arrhythmogenesis and Channelopathy,” 4th Asia Pacific Heart Rhythm Society (APHS 2011). 2011 年 9 月 21 日. Fukuoka

- ⑤ Ishihara K, Murata Y, Yamamoto T, Ichishima K, Fukudome K, Shioya T, Masuko S, Kubo Y. Role of the pH-sensitive strong inward rectifier Kir2.3 in the heart. The 88th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2011 年 03 月 28 日. Yokohama

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/physiol2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳 圭子 (石原 圭子)

(YANAGI KEIKO (ISHIHARA KEIKO))

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：70265990

(2) 研究分担者 無し

(3) 連携研究者

久保 義弘 (KUBO YOSHIHIRO)

生理学研究所・分子生理研究系・教授

研究者番号：80211887