

平成21年 5月29日現在

研究種目：基盤研究（c）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590209
 研究課題名（和文） 電気生理学および光学的手法を用いた内向き整流カリウムチャネルの分子機構の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of the molecular mechanisms of the inward rectifier potassium channel function using electrophysiological and optical approaches
 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：

内向き整流カリウムチャネル（Kir）の生理機能である細胞内から細胞外への K^+ 輸送を制御する分子機構について研究を行った。Kir2 を介する K^+ 輸送の際に細胞内ポリアミンによる孔ブロックが低親和性であるのは、ポリアミンが細胞膜領域に侵入できない様な孔の構造変化が生じ、細胞質領域でブロックが起きるからであることが分かった。細胞内 pH 酸性化による Kir2 の K^+ 輸送抑制には未知の細胞内粒子が関与するという新知見を得た。G 蛋白質で制御される Kir3 とされない Kir2 がヘテロチャネルを形成し得ることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：イオンチャネル、心筋電気生理

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：カリウムチャネル、内向き整流性、ポリアミン、カリウムイオン輸送

1. 研究開始当初の背景

内向き整流カリウムチャネル(Kir)は心筋、骨格筋、神経細胞など様々な細胞で重要な生理機能を担うカリウムチャネルである。Kirは生理的にカリウムイオン(K^+)を細胞内から外へ「外向きに」輸送し、膜電位を負に維持する働きをもつ。しかし生物物理学的には

K^+ を細胞外から細胞内へ「内向きに」通しやすく、外向きの K^+ 輸送は K^+ と膜電位に依存する制御メカニズムによって抑制的な調節を受けている。Kir2サブファミリーに属するサブユニットから成る古典的KirはKirの基本型であり、外向きの K^+ 輸送が細胞内陽イオン、すなわちポリアミン(有機イオン)や

マグネシウムイオン (Mg^{2+}) による膜電位依存性のポア (孔) ブロックによりコントロールされていることが知られている。しかしその詳細な分子機序を含め、Kir 機能の分子機構については未だ分かっていない事が多い。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、Kir2 の生理機能である細胞外への K^+ 輸送 (外向き電流) を制御する分子機構を明らかにすることである。我々は本研究課題開始前、詳細な電気生理学的研究を基に、古典的 Kir の分子実態である Kir2 を流れる外向き電流の大部分が、細胞内陽イオンによるブロックを比較的受けにくいモードにある少数の Kir2 によって輸送されるという説を提唱した (J Physiol (London) 556, 61-78, 2004; J Physiol (London) 563, 725-744, 2005)。この点を中心に Kir2 の外向き K^+ 輸送の分子機序を明らかにする目的で研究を開始した。

3. 研究の方法

(1) Kir2 孔内面位置する負電荷を持ったアミノ酸残基の側鎖を中性化する Kir2 点変異体を用いて、細胞内陽イオンによる K^+ と膜電位依存性の K^+ 輸送ブロックを解析した。哺乳動物由来の培養細胞に Kir2 遺伝子を発現させ、顕微鏡下に細胞膜の一部を電極先端で引き抜き、パッチクランプ法による膜電位固定実験法によって Kir2 電流を測定した。データはコンピューターに取り込み解析を行った。

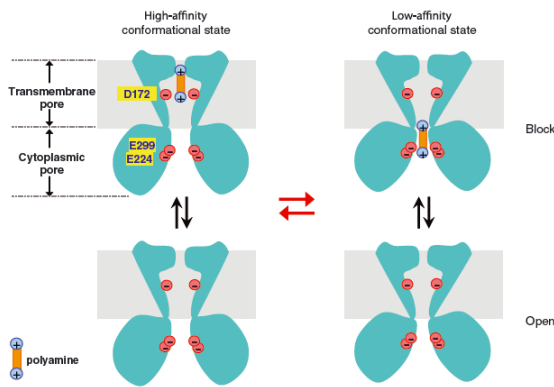
(2) 細胞内液の pH の酸性化によって誘発される Kir2 の遅い時間依存性の開閉機構による外向き K^+ 輸送の制御メカニズムについて Kir2 遺伝子を哺乳動物培養細胞に発現させ、(1)と同様の電気生理学的実験系を用いて検討を行った。

(3) 蛍光物質を結合した種々の Kir サブユニットを哺乳動物培養細胞に共発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージングによる解析を用い、細胞内局在を観察することによって、種々の Kir サブユニットのヘテロマー形成能について検討を行った。

(4) Kir サブユニットとムスカリン受容体 ($m2$) を哺乳動物培養細胞に共発現させ、副交感神経終末から分泌される神経伝達物質であるアセチルコリンが、Kir3.1 と Kir3.4 のヘテロチャネルと同様に Kir2.1 と Kir3.1 あるいは Kir2.1 と Kir3.4 の組み合わせで形成されたヘテロチャネルを活性化できるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞内液に存在する有機陽イオンであるポリアミンによる Kir2 孔ブロックには、高親和性と低親和性のブロックが関与するが、高親和性ブロックには細胞膜領域の孔内面に存在するアスパルギン酸残基 (D172) が有する負電荷がポリアミン結合部位として重要な働きを担い、細胞質内領域の孔内面に位置するグルタミン酸残基の有する負電荷 (E224 と E299) はブロックとアンブロックの反応速度を著しく促進する役割を持つことを明らかにした。低親和性ブロックの際には細胞質内領域のグルタミン酸残基の有する負電荷 (E224 と E299) がポリアミン結合部位を形成していることがわかった。これらのことから、Kir2 を介して外向き K^+ 輸送が起き際には Kir2 の構造変化によって細胞膜領域へポリアミン分子が侵入出来ず、細胞質領域で低親和性ブロックのみが生じることが示唆された (下図; J Physiol (London) 583, 891-908, 2007 より Fig. 10 を抜粋)。



(2) Kir2において細胞内液のpH低下（プロトンの増加）によって誘発される極めて遅い時間依存性を示すゲーティング機構の存在を見出した。その分子メカニズムには、未知の細胞内粒子が関与することを示唆する新知見を得た。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いたイメージングによる細胞内局在の検討を行った結果、G蛋白質による制御を受けるKirを形成するKir3サブユニットとG蛋白質による制御を受けないKirを形成するKir2サブユニットがヘテロチャネルを形成し得ることが示唆された。

(4) Kir2.1とKir3.1あるいはKir2.1とKir3.4の組み合わせで作られたヘテロチャネルはG蛋白質による制御を受けないと結論した。(3)であげた成果やそのほかの研究結果より、体組織から単離した細胞を用いた電気生理学的実験によって認知されるよりも、Kir分子の多様性はきわめて大きい可能性が示唆された。

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 4件)

① Ishihara K, Sarai N, Asakura K, Noma A, Matsuoka S. Role of Mg^{2+} block of the inward

rectifier K^+ current in cardiac repolarization reserve: A quantitative simulation. *J Mol Cell Cardiol* 47, 76-84 (2009). 査読有

② Ishihara K, Yamamoto T, Kubo Y. Heteromeric assembly of inward rectifier channel subunit Kir2.1 with Kir3.1 and with Kir3.4. *Biochem Biophys Res Commun* 380, 832-837 (2009). 査読有

③ 石原 圭子. 心室筋内向き整流カリウム電流と細胞内マグネシウムイオン. *日本心電学会誌 心電図* 29, 307-315 (2008). 査読無

④ Ishihara K, Yan D-H. Low-affinity spermine block mediating outward currents through Kir2.1 and Kir2.2 inward rectifier potassium channels. *J Physiol (Lond)* 583, 891-908 (2007). 査読有

[学会発表] (計 6件)

① 石原 圭子, Yan DH. 内向き整流 K^+ チャンネル Kir2.1 のゲーティングと細胞内 pH. 生理学研究所研究会 「膜機能分子ダイナミクス」の分子機構解明に向けて」 2008年9月5日 愛知県、岡崎市。

② 石原 圭子, Yan DH, 穎原 嗣尚. Kir2.1 内向き整流カリウムチャンネルの pH 依存性開閉機構. 第 85 回日本生理学会大会 2008年3月25日 東京。

③ Ishihara K. Low-affinity spermine block of strong inward rectifier Kir2 channels: role of cytoplasmic pore region. *Biophysical Society Meeting 52nd Annual Meeting*. 2008年2月5日 米国 Long Beach.

④ 石原 圭子, Yan DH. 内向き整流カリウムチャンネルの低親和性スperminブロック: 細胞内領域チャンネルポアの役割. 生理学研究所研究会 「イオンチャンネル・トランスポーターと心血管機能: 学際的取り組み

みによる新戦略」 2007年11月14日 愛知県岡崎市.

⑤ 石原 圭子. Inward rectifier potassium current I_{K1} during the cardiac myocellular repolarization: An in silico study. 4th International Symposium of Cell/Biodynamics Simulation Project, Kyoto University "Medical Systems Biology of the Heart" 2007年11月13日 京都.

⑥ 石原 圭子, Yan DH. 内向き整流 K^+ チャネルKir2.1、Kir2.2およびKir2.1(D172N)の機能差異. 第24回心電学会学術集会 平成2007年10月6日 名古屋.

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