
PIP₂による心筋緩徐活性型遅延整流性K⁺チャネルの 制御とその生理的意義の解明

(課題番号：15590184)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成 17 年 5 月

研究代表者 **松 浦 博**

(滋賀医科大学医学部教授)

イノシトールリン脂質代謝は神経伝達物質やホルモンの細胞作用に関わる細胞内情報伝達機構の1つとしてよく知られている。すなわち、アドレナリン受容体 (α_1)、ヒスタミン受容体 (H_1)、ATP受容体 (P2Y) 等の Gq タンパク連関型受容体の刺激は、ホスホリパーゼ C (PLC) を活性化して細胞膜構成リン脂質であるホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸 (PIP_2) からイノシトール 1,4,5-トリリン酸 (IP_3) とジアシルグリセロール (DG) を産生する。これらの2種類のセカンドメッセンジャーはそれぞれ細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇やリン脂質依存性蛋白キナーゼ (PKC) の活性化を惹起して、Gq タンパク連関型受容体によるさまざまな細胞機能の調節に関わっている。

近年、神経細胞や筋細胞の興奮性を制御するイオンチャネルやトランスポータの機能が細胞膜 PIP_2 自身によって調節を受けているということが明らかになり、 PIP_2 は膜輸送タンパクの新たな制御因子として注目を集めている。すなわち、Gq タンパク連関型受容体の刺激に伴って減少した PIP_2 によってイオンチャネルやトランスポータの活性が変化して細胞膜興奮性が影響を受けるということが多種類の細胞で明らかにされてきている。

一方、ヒトを含む多くのほ乳類の心筋細胞において、緩徐活性型遅延整流性 K^+ 電流 (I_{Ks}) は活動電位の再分極過程に必須の電流系であり、 I_{Ks} チャンネルの発現をコードする遺伝子の変異は心臓のイオンチャネル病として注目を集めている遺伝性 QT 延長症候群 (LQTS) の一因となることが明らかにされている。また、 I_{Ks} は交感神経伝達物質の標的イオンチャネルでもあり、 β -アドレナリン受容体刺激に伴う cAMP 依存性蛋白キナーゼ (PKA) の活性化や α_1 -アドレナリン受容体刺激による PKC の活性化により増大する。これらの受容体刺激に伴う I_{Ks} の増大反応は活動電位の再分極過程を促進するようにはたらか、このことは交感神経緊張時における L 型 $^+$ チャンネルを介する過度な Ca^{2+} の細胞内流入を抑制して心筋保護的に作用すると考えられている。

われわれはこれまで単離モルモット心房細胞にパッチクランプ法を適用した実験により、細胞膜 PIP_2 が I_{Ks} に対して抑制作用をおよぼすこと、またその抑制作用には PIP_2 のもつ負電荷が関与していることを明らかにしてきた。すなわち、 I_{Ks} もまた細胞膜 PIP_2 の標的イオンチャネルであると考えられるため、本研究課題においては、細胞膜 PIP_2 による I_{Ks} の調節の生理的意義の解明に焦点をあて検討を行った。具体的には、Gq タンパク連関型受容体による I_{Ks} の調節 (増大) における PIP_2 の役割、さらには心筋活動電位持続時間の決定における PIP_2 の役割等の検討を行った。P2Y (Gタンパク連関型ATP) 受容体や α_1 -アドレナリン受容体による I_{Ks} の増大反応に細胞膜 PIP_2 の減少が密接に関わっていること、さらには、P2Y (Gタンパク連関型ATP) 受容体による心筋活動電位持続時間の短縮に、細胞膜 PIP_2 の減少に伴う I_{Ks} の増大が関わっていること等を明らかにした。このように、心筋細胞における PIP_2 による I_{Ks} の調節機構は心筋電気活動に影響を与え生理的にも重要な意義をもつことが明らかとなった。

滋賀医科大学附属図書館



2004011562

研究組織

研究代表者：松浦 博（滋賀医科大学医学部教授）

研究分担者：林 維光（滋賀医科大学医学部助手）

研究分担者：豊田 太（滋賀医科大学医学部助手）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	2,100	0	2,100
平成 16 年度	1,500	0	1,500
総計	3,600	0	3,600

研究発表

(1) 学会誌等

1. Sanada, M., Matsuura, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K. and Yasuda, H. (2004). Cytosolic Ca^{2+} under high glucose with suppressed Na^+/K^+ pump activity in rat sensory neurons. *Neuroreport* 15:197-201.（平成 16 年 1 月）
2. Hiramoto, T., Nonaka, Y., Inoue, K., Yamamoto, T., Omatsu-Kanbe, M., Matsuura, H., Gohda, K. and Fujita, N. (2004). Identification of endogenous surrogate ligands for human P2Y receptors through an in silico search. *J Pharmacol Sci* 95:81-93.（平成 16 年 5 月）
3. Okada, A., Ueyama, H., Toyoda, F., Oda, S., Ding, W.-G., Tanabe, S., Yamade, S., Matsuura, H., Ohkubo, I. and Kani, K. (2004). Functional role of the hCNGB3 in regulation of human cone CNG channel: effect of rod monochromacy-associated mutations in hCNGB3 on channel function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2324-2332.（平成 16 年 7 月）
4. Omatsu-Kanbe, M., Shibata, M., Yamamoto, T., Isono T. and Matsuura, H. (2004). Actin filaments play a permissive role in the inhibition of store-operated Ca^{2+} entry by extracellular ATP in rat brown adipocytes. *Biochem J* 381:389-396.（平成 16 年 7 月）
5. Ding, W.-G., Toyoda, F. and Matsuura, H. (2004). Regulation of cardiac I_{Ks} potassium current by membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 279:50726-50734.（平成 16 年 12 月）
6. Aiba, T., Shimizu, W., Inagaki, M., Noda, T., Miyoshi, S., Ding, WG., Zankov, D. P., Toyoda, F., Matsuura, H., Horie, M. and Sunagawa, K. (2005). Cellular and ionic mechanism for drug-induced long QT syndrome and effectiveness of verapamil. *J Am Coll Cardiol* 45:300-307.（平成 17 年 1 月）
7. Zankov, D.P., Ding, W.-G., Matsuura, H. and Horie, M. (2005). Open-state unblock characterizes acute inhibition of I_{Ks} potassium current by amiodarone in guinea-pig ventricular myocytes. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16:314-322.（平成 17 年 3 月）
8. Toyoda, F., Ding, W.-G. and Matsuura, H. (2005). Responses of the sustained inward current to autonomic agonists in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. *Br J Pharmacol* 144:660-668.（平成 17 年 3 月）

9. Yasuda, Y., Matsuura, H., Ito, M., Matsumoto, T., Ding, WG. and Horie, M. (2005). Regulation of the muscarinic K^+ channel by extracellular ATP through membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig atrial myocytes. *Br J Pharmacol* 145:156-165. (平成 17 年 5 月)

(2) 口頭発表

〔国際学会発表〕

1. Hiroyuki Toda, Wei-Guang Ding, Futoshi Toyoda, Yoh Yasuda, Makoto Ito, Minoru Horie, Hiroshi Matsuura. Potentiation of I_{Ks} potassium current in guinea-pig ventricular myocytes by sphingosine-1-phosphate. The 31st International Congress on Electrophysiology (June 27-July 1, 2004, Kyoto).
2. Futoshi Toyoda, Dimitar Zankov, Wei-Guang Ding, Hiroshi Matsuura. Differential effects of mefenamic acid on cardiac I_{Ks} and KCNQ1/KCNE1 channels. The 31st International Congress on Electrophysiology (June 27-July 1, 2004, Kyoto).
3. Yoh Yasuda, Hiroyuki Toda, Wei-Guang Ding, Futoshi Toyoda, Makoto Itoh, Minoru Horie, Hiroshi Matsuura. Heterogeneous distribution of the muscarinic K^+ channels in guinea-pig atria. The 31st International Congress on Electrophysiology (June 27-July 1, 2004, Kyoto).
4. Dimitar P. Zankov, Futoshi Toyoda, Wei-Guang Ding, Hiroshi Matsuura, Minoru Horie. Acute inhibition on I_{Ks} by amiodarone in guinea-pig ventricular myocytes. The 31st International Congress on Electrophysiology (June 27-July 1, 2004, Kyoto).
5. Dimitar P. Zankov, Futoshi Toyoda, Wei-Guang Ding, Hiroshi Matsuura, Minoru Horie. Stimulatory action of angiotensin II on I_{Ks} potassium current in guinea-pig atrial cells. The 31st International Congress on Electrophysiology (June 27-July 1, 2004, Kyoto).
6. D. P. Zankov, F. Toyoda, W-G. Ding, H. Matsuura, M. Horie. Stimulatory action of angiotensin II on the slow component of delayed rectifier potassium current in guinea pig atrial cells. The XXXV International Congress of Physiological Sciences (March 31-April 5, 2005, San Diego, CA, USA).

〔国内学会・研究会発表〕

1. 丁 維光、豊田 太、松浦 博. リゾリン脂質による心筋 I_{Ks} チャネルの調節. 平成 15 年度生理学研究所研究会『心血管イオンチャネルの病態に関する新たな展開 - ゲノミクスからプロテオミクスへ - 』 (平成 15 年 11 月 25 日~26 日) .
2. Hiroyuki Toda, Yoh Yasuda, Makoto Ito, Minoru Horie & Hiroshi Matsuura. Enhancement of I_{Ks} potassium current in guinea-pig ventricular myocytes by sphingosine-1-phosphate through a pertussis toxin-sensitive G protein. 第 68 回日本循環器学会 (平成 16 年 3 月 27 日~29 日) .
3. 岡田 明, 上山久雄, 豊田 太, 丁 維光, 小田早苗, 山出新一, 松浦 博. ヒト錐体細胞 cGMP 依存性陽イオンチャネル機能の電気生理学的検討; 杆体一色型色覚における遺伝子変異の検索・機能解析. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日) .

4. 小田早苗, 上山久雄, 豊田 太, 岡田 明, 丁 維光, 松浦 博, 山出新一. ヒト錐体細胞 CNG チャンネルにおける CNBD の構造機能連関. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日).
5. 尾松万里子, 井上和子, 藤田典久, 松浦 博. 脂肪細胞分化に対する細胞外 ATP の作用. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日)
6. 丁 維光, 戸田裕之, ザンコフ ディミター, 安田 洋, 豊田 太, 松浦 博. リゾホスファチジン酸による心房筋 I_{Ks} の制御. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日)
7. 戸田裕之, 丁 維光, 安田 洋, 堀江 稔, 松浦 博. スフィンゴシン 1 リン酸による心筋 IKs の増大作用. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日).
8. 豊田 太, 丁 維光, 尾松万里子, 松浦 博. マウス心房由来 HL-1 細胞における I_{Kr} の解析. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日)
9. 安田 洋, 戸田裕之, 丁 維光, 豊田 太, 堀江 稔, 松浦 博. モルモット心房におけるムスカリン性 K チャンネルの部位間の比較. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日).
10. Zankov Dimitar, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, 堀江 稔. AT1 受容体による心筋 IKs の調節機構. 第 81 回日本生理学会大会 (平成 16 年 6 月 2 日~4 日).
11. 尾松万里子, 松浦 博. 脂肪細胞における P2Y 受容体の機能. 平成 16 年度生理学研究所研究会『痛み情報伝達における ATP およびアデノシンの生理機能』 (平成 16 年 8 月 26 日~27 日)
12. 丁 維光, 豊田 太, 安田 洋, 戸田裕之, 松浦 博. リゾホスファチジルコリン (LPC) による心筋 I_{Ks} チャンネルの制御機構. 第 21 回日本心電学会学術集会 (平成 16 年 9 月 13 日~14 日)
13. 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博. メフェナム酸による心筋 I_{Ks} ならびに KCNQ1/KCNE1 電流の修飾の違い. 第 21 回日本心電学会学術集会 (平成 16 年 9 月 13 日~14 日).
14. 安田 洋, 戸田裕之, 豊田 太, 丁 維光, 伊藤 誠, 堀江 稔, 松浦 博. モルモット心房における $I_{K,ACh}$ の分布. 第 21 回日本心電学会学術集会 (平成 16 年 9 月 13 日~14 日).
15. 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博. 心筋 I_{Ks} と KCNQ1/KCNE1 チャンネルのメフェナム酸感受性の違い. 平成 16 年度生理学研究所研究会『心臓血管系イオンチャンネルの構造障害に基づく病態発症機構の解明とその治療戦略の構築』 (平成 17 年 3 月 8 日~9 日).
16. 尾松万里子, 藤居祐介, 松浦 博. ホスホリパーゼ C 連関受容体アゴニストおよび SERCA 阻害剤によって引き起こされる容量性カルシウム流入活性化機構の相違. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日).
17. 久保多恵子, 丁 維光, 豊田 太, 藤居祐介, 尾松万里子, 三浦義紀, 松浦 博. M_1 ムスカリン性受容体及び P1(4)P5-キナーゼによる HERG チャンネルの修飾. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日)

18. 丁 維光, 豊田 太, 上山久雄, 松浦 博. G2A 受容体を介したリゾホスファチジルコリンによる心筋 I_{Ks} の制御. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日) .
19. 戸田裕之, 丁 維光, 安田 洋, 豊田 太, 堀江 稔, 松浦 博. モルモット心筋細胞において $\alpha 1$ 受容体刺激による緩徐活性型遅延整流性 K^+ チャンネル電流の増大反応は $PKC\epsilon$ を介する. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日) .
20. 豊田 太, 丁 維光, Zankov Dimitar, 尾松万里子, 松浦 博. 心筋 I_{Ks} と $KCNQ1/KCNE1$ チャンネルのメフエナム酸感受性. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日) .
21. 早瀬史子, 松浦 博, 豊田 太, 濱田可奈子, 真田 充, 尾松万里子, 安田 斎. 糖尿病ラット脊髄後根神経節細胞におけるテトロドトキシン抵抗性ナトリウムチャンネルへの LY33351 の効果. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日) .
22. Zankov Dimitar, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, 堀江 稔. マウス心房筋由来 HL-1 細胞における Na/K ポンプ電流の電気生理学的特性. 第 82 回日本生理学会大会 (平成 17 年 5 月 18 日~20 日) .

研究成果

本研究課題では、細胞膜 PIP₂ による心筋 I_{Ks} の抑制作用の生理的意義を検討・解明する目的でモルモット単離心房筋細胞にパッチクランプ法を適用して実験を行い、以下に示す成果を得た。なお、その詳細は添付した論文に記載する。

1. 細胞外 ATP ($\geq 0.1 \mu\text{M}$) は P2Y 受容体刺激を介して I_{Ks} 活性を増大させるが、そのシグナル伝達機構として Gq-ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化による細胞膜の PIP₂ の減少が主要な役割を果たしている。すなわち、細胞膜に存在する PIP₂ は I_{Ks} に対して持続的に (恒常的に) 抑制作用をおよぼしており、P2Y 受容体-Gq-PLC 経路の活性化に伴う細胞膜 PIP₂ 濃度の減少は I_{Ks} の増大に結びつくと考えられた。
2. α_1 -受容体のアゴニストであるフェニレフリン (PHE) は Gq 蛋白-ホスホリパーゼ C (PLC) を活性化して I_{Ks} を増大させることが明らかにされている。この PHE による I_{Ks} の増大作用にも Gq-PLC を介した PKC の活性化に加えて、細胞膜 PIP₂ の減少も関与している。
3. 心筋細胞を低浸透圧溶液に曝すと細胞は膨張し I_{Ks} が増大することが知られているが、その作用にも部分的にはあるが細胞膜 PIP₂ の減少が関与している。
4. P2Y 受容体刺激により活動電位持続時間 (APD) は 2 相性に短縮するが、初期相 (ATP 投与 1 分以内) はムスカリン性カリウムチャネル (I_{K,ACh}) の活性化が、後期相 (ATP 投与 1 分以降) は I_{Ks} の増大が主に関与している (APD: コントロール, $66.1 \pm 5.2 \text{ ms}$; 初期相, $19.9 \pm 1.6 \text{ ms}$; 後期相, $35.4 \pm 2.9 \text{ ms}$, $n = 5$)。すなわち、細胞膜 PIP₂ はチャネル (I_{Ks} および I_{K,ACh}) 活性の修飾を介して心筋 APD の調節にも関与している。これらの実験結果により、ほ乳類心筋細胞において細胞膜 PIP₂ による I_{Ks} の修飾は Gq-PLC と関連した受容体による膜興奮性の制御に密接に関わっていることが強く示唆された。

このように、細胞膜 PIP₂ による心筋 I_{Ks} の抑制作用は、P2Y 受容体や α_1 -受容体刺激による I_{Ks} の増大作用に密接に関与していること、さらには細胞膜 PIP₂ は I_{Ks} や I_{K,ACh} のイオンチャネル活性の制御を介して心筋細胞の活動電位持続時間の決定に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。