
イノシトールリン脂質による 心筋遅延整流性K⁺チャネルの 調節機構の解析

(課題番号：13670042)

平成13年度～平成14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 15 年 5 月

研究代表者 松浦 博
(滋賀医科大学医学部教授)

近年、細胞膜構成リン脂質の一つであるホスファチジルイノシトール 4,5-ニリン酸 [phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PtdIns(4,5)P₂] が2種のセカンドメッセンジャー [イノシトール 1,4,5-三リン酸 (IP₃), ジアシルグリセロール(DG)] 産生の前駆体として働くのみならず、それ自身が K⁺ チャネルや Na⁺-Ca²⁺交換輸送体などの膜輸送蛋白の機能調節に重要な役割を果たしているという実験結果が明らかにされてきている。また、その調節機構として、PtdIns(4,5)P₂ のもつ負電荷と膜輸送蛋白を構成する陽性荷電アミノ酸の陽電荷との間の静電結合 (electrostatic binding) の関与が考えられている。

一方、ヒトを含む多くの動物種の心筋細胞に存在する緩徐活性型遅延整流性 K⁺ チャネル (slowly activating delayed rectifier K⁺ channel, I_{Ks}) は細胞膜の脱分極により活性化され活動電位の再分極過程を促進する生理的に重要なイオンチャネルである。I_{Ks} は β-アドレナリン性受容体刺激に伴う cAMP 依存性蛋白キナーゼ (PKA) や α₁-アドレナリン性受容体刺激によるリン脂質依存性蛋白キナーゼ (PKC) の活性化、さらには細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇 (≥10⁻⁸ M) によって増大することが知られている。これらの受容体や細胞内イオンを介する I_{Ks} の増大反応は活動電位持続時間を短縮する作用をもち、その結果、膜電位依存性 Ca²⁺チャネルを通る過度な Ca²⁺の細胞内流入を抑制して心筋保護的にはたらくと考えられる。さらに、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 (LQT) の遺伝子解析により、LQT1 は I_{Ks} チャネル蛋白の α サブユニットの発現をコードする *KCNQ1* 遺伝子の変異に、LQT5 は β サブユニットの発現をコードする *KCNE1* 遺伝子の変異に起因することが明らかにされてきた。すなわち、いずれの遺伝子の変異も I_{Ks} チャネルの機能障害 (外向き K⁺ チャネル電流の減少) を引き起こし、それが活動電位持続時間 (心電図上 QT 時間に相当) の延長、さらには torsade de pointes 型心室頻拍の発生、失神発作、急死に結びつくと考えられている。

我々はモルモット単離心房筋細胞ならびに心室筋細胞にパッチクランプ法を適用した実験により、細胞外に投与した ATP は 0.1 μM の低い濃度においても I_{Ks} を増大させることを明らかにしてきた (Matsuura *et al.* *J Physiol*, 1996; Matsuura & Ehara, *J Physiol* 1997; Matsubayashi, Matsuura & Ehara, *Pflügers Arch* 1999)。その増大反応に関わる情報伝達機構の検討を行い、P2Y 受容体、百日咳毒素 (pertussis toxin, PTX) 非感受性 G 蛋白および何らかのリン酸化反応の関与は明らかにしてきたが、最終的な情報伝達分子の特定には至っていなかった (PKA, PKC, 細胞内 Ca²⁺ の関与に関してはいずれも否定的な実験結果を得ていた)。心筋細胞を含め多くの種類の細胞において、P2Y 受容体刺激は PTX 非感受性 G 蛋白 (Gq)、ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化を介して PtdIns(4,5)P₂ の加水分解を促進することが知られている。そこで、本研究課題において、P2Y 受容体による I_{Ks} の調節機構に細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の減少が関わっているという仮説について検討を行った。その結果、細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ は I_{Ks} チャネル蛋白に対して抑制性作用をおよぼし、P2Y 受容体-Gq-PLC の活性化に伴う細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の減少が細胞外 ATP による I_{Ks} の増大反応に関与しているということが明らかになった。細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ レベルは P2Y 受容体以外にも細胞膜に多く存在する他の Gq-PLC 連関受容体 (例えば、α₁-アドレナリン性受容体やエンドセリン受容体)、さらには細胞内のポリアミン等の陽性荷電分子によっても制御されていることが知られている。よって、今後これらの細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ レベルに影響を与えるシグナル分子による I_{Ks} の調節、さらにはその情報伝達機構における PtdIns(4,5)P₂ の役割について研究を発展させていき、本研究課題によって得られた細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ による I_{Ks} の修飾作用の生理的役割さらには病態生理学的意義について解明していきたい。



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 13 年度	1,800	0	1,800
平成 14 年度	1,200	0	1,200
総計	3,000	0	3,000

研究発表

(1) 学会誌等

Matsuura, H., Ehara, T., Ding, W.G., Omatsu-Kanbe, M., Isono, T. (2002). Rapidly and slowly activating components of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig sino-atrial node pacemaker cells. *J Physiol* 540: 815-830. (平成 14 年 5 月)

Sanada, M., Yasuda, H., Omatsu-Kanbe, M., Sango, K., Isono, T., Matsuura, H., Kikkawa, R. (2002). Increase in intracellular Ca²⁺ and calcitonine gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 111:413-422. (平成 14 年 5 月)

Shimizu, K., Shintani, Y., Ding, W.-G., Matsuura, H., Bamba, T., (2002). Potentiation of slow component of delayed rectifier K⁺ current by cyclic GMP *via* two distinct mechanisms: inhibition of phosphodiesterase 3 and activation of protein kinase G. *Br J Pharmacol* 137:127-137. (平成 14 年 9 月)

Ding, W.-G., Toyoda, F. and Matsuura, H. (2002). Blocking action of chromanol 293B on the slow component of delayed rectifier K⁺ current in guinea-pig sino-atrial node cells. *Br J Pharmacol* 137:253-262. (平成 14 年 9 月)

Omatsu-Kanbe, M., Isono, T. and Matsuura, H. (2002). Multiple P2 receptors contribute to a transient increase in intracellular Ca²⁺ concentration in ATP-stimulated rat brown adipocytes. *Exp Physiol* 87:643-652. (平成 14 年 11 月)

Hamada, K., Matsuura, H., Sanada, M., Toyoda, F., Omatsu-Kanbe, M., Kashiwagi, A. and Yasuda, H. (2003). Properties of the Na⁺/K⁺ pump current in small neurons from adult rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol* 138:1517-1527. (平成 15 年 4 月)

(2) 口頭発表

尾松万里子, 松浦 博

ATP 受容体刺激による細胞骨格の再構築

平成 13 年度生理学研究所研究会『ATP 受容体の生理機能と疼痛のメカニズム』(平成 13 年 8 月 22 日～23 日)

豊田 太, 丁 維光, 尾松万里子, 松浦 博, 鷹野 誠, 堀江 稔,
膜伸展による心筋緩徐活性化型遅延整流性 K^+ チャネル(I_{Ks})の増大機構
平成 13 年度生理学研究所研究会『イオンチャネルの構造機能連関と制御機能に学ぶ心血管疾患の病態生理学』(平成 13 年 11 月 27 日~28 日)

丁 維光, 豊田 太, 清水健太郎, 松浦 博
イノシトールリン脂質による心筋遅延整流性 K^+ チャネル(I_{Ks})の制御
第 79 回日本生理学会大会ポスター発表(平成 14 年 3 月 28 日~30 日)

濱田可奈子, 安田 斎, 真田 充, 豊田 太, 尾松万里子, 松浦 博
ラット脊髄後根神経節小径細胞における Na^+/K^+ ポンプ電流の検討
第 79 回日本生理学会大会ポスター発表(平成 14 年 3 月 28 日~30 日)

尾松万里子, 磯野高敬, 柴田 大, 松浦 博
P2 受容体刺激によるアクチン重合と容量性 Ca^{2+} チャネルの制御
第 79 回日本生理学会大会口演発表(平成 14 年 3 月 28 日~30 日)

豊田 太, 丁 維光, 清水健太郎, 尾松万里子, 鷹野 誠, 堀江 稔, 松浦 博
パッチ膜電流記録による I_{Ks} および *KCNQ1/KCNE1* チャネルの制御機構の解析
第 79 回日本生理学会大会口演発表(平成 14 年 3 月 28 日~30 日)

清水健太郎, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博
プロテインキナーゼ G(PKG)による心筋遅延整流性 K^+ チャネル(I_{Ks})の増強作用
第 79 回日本生理学会大会口演発表(平成 14 年 3 月 28 日~30 日)

尾松万里子, 松浦 博
ATP 受容体による脂肪細胞の membrane ruffling
平成 14 年度生理学研究所研究会『ATP 受容体の生理機能の解明:特にグリア細胞での機能』(平成 14 年 8 月 29 日~30 日)

豊田 太, 丁 維光, 松浦 博
KvLQT1/minK チャネルの温度依存性
第 19 回日本心電学会学術集会口演発表(平成 14 年 9 月 9 日~10 日)

丁 維光, 豊田 太, 松浦 博
 PIP_2 によるモルモット心筋緩徐活性化型遅延整流性 K^+ 電流(I_{Ks})の制御
第 19 回日本心電学会学術集会口演発表(平成 14 年 9 月 9 日~10 日)

松浦 博, 丁 維光
細胞膜 PIP_2 による心筋緩徐活性化型遅延整流性 K^+ チャネル(I_{Ks})の制御
平成 14 年度生理学研究所研究会『イオンチャネルのプロテオミクスと心血管系疾患の病態に関する新たな展開』(平成 14 年 11 月 25 日~26 日)

井上和子, 尾松万里子, 藤田典久, 松浦 博
3T3-L1 細胞における細胞外 ATP のアクチンフィラメント再構築に対する多様な影響
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

尾松万里子, 井上和子, 藤田典久, 松浦 博
脂肪細胞における容量性 Ca^{2+} に及ぼす細胞骨格の影響
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

濱田可奈子, 松浦 博, 真田 充, 豊田 太, 尾松万里子, 柏木厚典, 安田 斎
成熟ラット後根神経節小径神経細胞の Na^+/K^+ ポンプ電流解析
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

岡田 明, 上山久雄, 豊田 太, 丁 維光, 松浦 博, 山出新一
ヒト錐体細胞 cGMP 依存性チャネルにおける β サブユニットの機能的意義
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

安田 洋, 丁 維光, 堀江 稔, 松浦 博
細胞外 ATP によるムスカリン性 K チャネルの調節における細胞膜 PIP2 の関与
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

丁 維光, 豊田 太, 安田 洋, 松浦 博
リゾリン脂質による心筋 I_{Ks} の増大
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

豊田 太, 丁 維光, 尾松万里子, 鷹野 誠, 松浦 博
COS7 細胞における M1 受容体刺激による KCNQ1/KCNE1 電流の修飾
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

磯野高敬, 丁 維光, 豊田 太, 尾松万里子, 松浦 博
モルモット洞房結節細胞の HCN4 の機能解析
第 80 回日本生理学会大会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 24 日~26 日)

Yasuda, Y., Matsumoto, T., Ohira, N., Takashima, H., Tarutani, Y. and Matsuura, H.
Involvement of membrane PIP2 in the regulation of the muscarinic K^+ channel by extracellular ATP
第 67 回日本循環器学会学術総会ポスター発表 (平成 15 年 3 月 28 日~30 日)

研究成果

本研究課題の成果を要約すると以下の通りである。なお、その詳細は添付した論文に記載する。

モルモット心臓から酵素処理により得られた単離心房筋細胞に全細胞型パッチクランプ法(whole-cell patch-clamp mode)を適用して、イノシトールリン脂質による緩徐活性型遅延整流性 K^+ チャネル (I_{Ks})の調節機構の解析を行った。細胞灌流液には急速活性型遅延整流性 K^+ チャネル (I_{Kr})の阻害剤である E-4031 (5 μ M)を加えて実験を行った。 I_{Ks} は保持電位-50 mV から種々の膜電位に脱分極パルスを与えて活性化し、活性化の程度は-50 mV に再分極したときに発生する末尾電流 (tail current) の大きさで評価した。

1. 高濃度 ($\geq 10 \mu$ M) の wortmannin はホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ(PI-4K)をブロックすることにより細胞膜のホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (PtdIns(4,5)P₂) 量を減少させることが知られている。Wortmannin (50 μ M) をパッチ電極を介して細胞内に負荷すると I_{Ks} の大きさは約 2 倍に増大した。
2. PtdIns(4,5)P₂ (100 μ M) を細胞内に負荷すると I_{Ks} の大きさは約 1/3 に減少した。
3. 抗 PtdIns(4,5)P₂ 抗体 (30 nM) を細胞内に負荷すると I_{Ks} の大きさは約 2 倍に増大した。
4. 細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ のもつ負電荷を中和する Al³⁺ (50 μ M) や neomycin (50 μ M) を細胞内に投与すると I_{Ks} の大きさは約 2 倍に増大した。

これらの実験結果により、モルモット心房筋細胞の I_{Ks} は細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ により抑制性の調節を受けており、それには PtdIns(4,5)P₂ のもつ負電荷が関わっている可能性が示唆された。

さらに、この細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ による I_{Ks} の抑制性調節機構の生理的意義を明らかにする目的で、同様に単離モルモット心房筋細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用して以下の実験を行った。

5. 細胞外 ATP (50 μ M) による P2Y 受容体刺激は I_{Ks} に対して増大作用をおよぼすが、パッチ電極を介して細胞内に PtdIns(4,5)P₂ (100 μ M) を負荷した条件下で細胞外 ATP (50 μ M) を作用させると I_{Ks} の増大反応は著明に減少した。
6. 細胞内に高濃度(50 μ M)の wortmannin を投与して I_{Ks} を増大させた後に細胞外 ATP (50 μ M) を投与すると I_{Ks} の増加率は有意に減少した。

これらの実験結果により、P2Y 受容体刺激による I_{Ks} の増大反応には P2Y 受容体-Gq-ホスホリパーゼ C (PLC) の活性化による細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の消費・減少が第一義的に関わっていると考えられる。

7. 細胞内に 3 価の陽電荷をもつスベルミジンや 4 価の陽電荷をもつスベルミンを投与すると、 I_{Ks} が徐々に増大していった。スベルミジンやスベルミンなどの低分子塩基性物質であるポリアミンは細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ のもつ陰性荷電と電気的に結合する可能性が示唆されている。よって、本実験結果は、細胞内ポリアミンが細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ の陰性荷電を中和することにより、PtdIns(4,5)P₂ による I_{Ks} チャネルの抑制作用がブロックされて I_{Ks} が増大した可能性を示唆する。

このように、細胞膜 PtdIns(4,5)P₂ による I_{Ks} の抑制性調節機構は神経伝達物質やさらには細胞内物質による I_{Ks} の調節に密接に関わっている可能性が示唆された。