

イオンチャネル機能の解明

長 島 雅 人, 當 瀬 規 嗣

札幌医科大学医学部生理学第一講座
大学院医学研究科細胞機能情報学

Study of Ion Channel Function

Masato Nagashima, Noritsugu Tohse

Department of Cellular Physiology and Signal Transduction, Sapporo Medical University
School of Medicine

ABSTRACT Ion channel is a membrane-spanning protein forming pore, through which ion moves across plasma membrane. Ion channel plays important role for several cellular functions, i. e. excitation, contraction, and secretion. This review introduces summaries of studies about ion channel function in our department. Our studies involve structure-function relationship for ion channel, developmental changes in ion channel function, physiological function of ion channel in non-excitabile cells, and pathophysiology for ion channel function. The broad area of study of ion channel function suggest that ion channel is essential to solve several issues of physiology and pathophysiology.

(Accepted December 21, 2001)

Key words: Ion channel, Physiology, Patch clamp, Molecular biology

イオンチャネルは細胞膜上に存在するタンパク質であり、水を満たしたポア（細孔）を持ち、イオンを通過させる。このイオンの動きにより、細胞膜の両側に電荷が貯まることとなり、細胞膜電位を形成する。イオンチャネルの存在は神経の興奮性の研究から、Hodgkin & Huxley¹⁾によってその存在を予想された。その後の研究の展開から、タンパク質としての実体が明らかとなり、イオンチャネル1分子を流れる電流（イオン流）の測定も成功し（パッチクランプ法）²⁾、現在、神経、骨格筋などの「興奮」の実体として認められている。加えて、イオンチャネルは単に細胞膜の電気現象を担うだけの存在ではない。近年のパッチクランプ法による研究の展開は、非興奮性細胞の細胞膜上にもイオンチャネルが存在することを教えている。そして、それらのイオンチャネルは、電流そのものよりも、細胞膜を越えたイオンの輸送の経路の一部としてはたらし、それらの細胞の生理機能に関わっている。その例として、赤血球の変形能、尿細管上皮細胞での尿成分の調節、胃壁細胞での胃酸分泌などがあげられる。

このようにして、あらゆる生体の生理機能に関与しているイオンチャネルの研究は、生理学として本源的な研究であるといえる。当教室では、イオンチャネル機能が生理機能全体を支配している心筋細胞を中心として、イオンチ

ヤネルの構造、機能、病態に関する研究を幅広く展開している。本稿では、その代表的なものを紹介しつつ、イオンチャネル学の方向性と可能性を示すこととする。

1 イオンチャネルの構造と機能の関連

先に述べたように、イオンチャネルの実体が膜タンパク質であることが明らかとなり、様々なイオンチャネルの遺伝子がクローニングされてきた。当教室では、心臓の電気現象を解明する心臓電気生理学の立場から、心筋などからクローニングされ、再構成されたイオンチャネルの活動と、生体心筋のイオンチャネル活動の差異を検討している。差異の検討は、クローニングされた遺伝子が生体の蛋白質分子のすべてを説明できるかどうかのヒントを与え、とくにサブユニット構造のあり方に対して重要な情報を与えると考えている。

1・1 心筋からクローニングされた内向き整流性カリウムチャネルの特性

内向き整流特性を示すカリウムチャネルは、心筋において初めて見いだされて以来、様々な細胞で発見され、その時間依存性の乏しさから、静止膜電位の形成に重要であると考えられている。このチャネルをコードする遺伝子はKir 2ファミリーとして、Kuboら³⁾により報告された。

しかし、それはマクロファージからクローニングされたものであった。心筋での Kir 2 の発見は Ishii ら⁴⁾ と Takahashi ら⁵⁾ によりなされた。しかし、Kir 2 のチャネル活動が、生体で観察される内向き整流性カリウムチャネルとの比較検討はなされていなかった。そこで、我々は、ウサギ心筋から Kir 2.1(RBHIK1) をクローニングした東北大学第二薬理との共同研究で、single-channel recording による比較検討を加えた⁶⁾。Kir 2.1(RBHIK1) の遺伝子より作成した mRNA をカエル卵母細胞に注入し、発現してきた単一チャネル活動をパッチクランプ法にて観察した。単一チャネルの伝導度は、約 18 pS で、ウサギ心室筋細胞で観察された内向き整流性カリウムチャネルの単一チャネル伝導度 (24 pS) に近いものであった。さらに、内向き整流特性や各種カリウムチャネル遮断物質 (TEA, Cs⁺, Ba²⁺) の作用から、Kir 2.1 はウサギ心室筋の静止膜電位を決定している内向き整流性カリウムチャネルの遺伝子であると結論づけた。

1・2 心筋のカルシウムチャネルの不活性化過程と構造の関わり

心筋には L 型カルシウムチャネル (ジヒドロピリジン受容体) が豊富に存在する。細胞外から Ca²⁺ を細胞内に導くことから、自動能や興奮収縮連関で枢軸としてはたらし、生体に必要不可欠なチャネルである。さらに、ジヒドロピリジン誘導体をはじめとするカルシウム拮抗薬の標的であり、薬理的、臨床的にも重要なチャネルである。この心筋の L 型カルシウムチャネルのサブユニット構造は、イオンの通路 (pore) を形成する α_{1c} 、細胞外側の pore

の周囲を囲む $\alpha_2\delta$ 、そして α_{1c} の細胞内側に結合する β_2 の 3 つのサブユニットからなる (Fig.1)。このうち、 β_2 サブユニットには多数の splice variant が報告されており、心筋では β_{2a} が排他的に発現しているとされてきた⁷⁾。 β_2 サブユニットはカルシウムチャネルの発現量や不活性化過程形成に重要な役割を持っていると考えられているが、 β_{2a} を用いた再構成実験では不活性化過程の進行が、生体心筋のそれに比較して遅いことが示されており、この不一致が問題であった。さらに、最近、PCR 法による再検討の報告があり⁸⁾、ラット心筋では β_{2a} が検出できないことが示され、心筋カルシウムチャネルの β_2 サブユニットの構造は結論を得ていなかった。そこで、我々はラット心室筋に β_{2a} と似ているがおそらく N 末端側が異なる splice variant があると考え、5'-RACE による検索を行った⁹⁾。結果としてヒトの心室筋でのみ報告があった β_{2c} とほぼ同様の配列を持つ遺伝子がクローニングされた。この β_{2c} の機能は全く解析されていなかったもので、BHK 細胞に α_{1c} 、 $\alpha_2\delta$ と共に遺伝子導入し、カルシウムチャネルを再構成して、その機能を検討した。再構成されたカルシウムチャネル電流はラット心室筋細胞で観察される L 型カルシウムチャネル電流の不活性化過程と同様の経過を示した。こうして、 β_{2c} は心筋細胞 L 型カルシウムチャネルの構成要素であることが明らかとなった。

2 心筋イオンチャネルの発生的変化

発生期は臓器形態や機能が著しく変化する時期であり、その機能を担うタンパク質の発現もダイナミックに変化し

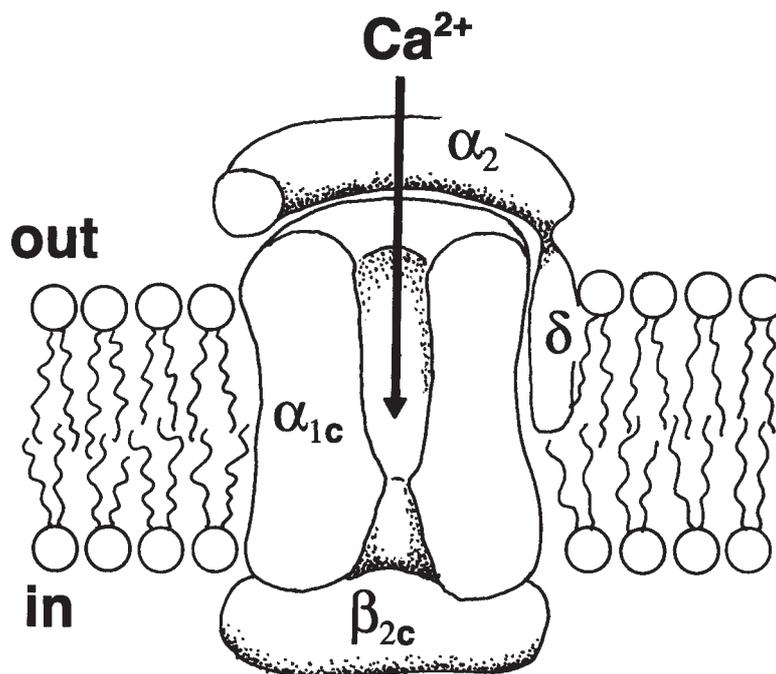


Fig. 1 Structure of L-type Ca²⁺ channel in cardiomyocytes

ていることは想像に難くない。このことは、イオンチャネルに関しても同じであり、とくに心筋細胞では、発生期でのイオンチャネル機能の変化に関する報告が蓄積されてきた¹⁰⁾。そこで、当教室では、この機能上の変化の基盤となる、遺伝子上の変化を明らかにすることを目的に、おもにラット胎児心筋を用いた、イオンチャネルの構造解析や機能解析を行っている。

2・1 発生期における内向き整流カリウムチャネル遺伝子の消長

胎生早期のラット心筋では静止膜電位は形成されておらず、拡張期の膜電位は動揺しており自発的な活動電位の発火を見る。この自動能は成長と共に消失し、出生前には静止膜電位が形成され自動能が消失する。そこで、我々は心筋分化の過程を明らかにしてゆく立場から、微生物学講座の協力の下、この静止膜電位形成過程におけるイオンチャネル機能の変化を遺伝子レベルで追求した¹¹⁾。すでに述べたように、心筋細胞の静止膜電位を決定するのは内向き整流性カリウムチャネルであるが、このチャネルによる電流は、胎生早期ですでに観察され、胎生中期から後期にかけて飛躍的に増大することがわかった。そこで、この内向き整流性カリウムチャネルをコードする遺伝子を検索したところ、Kir 2.1 および Kir 2.2 二つの遺伝子の発現が確認された。したがって、胎生中期での電流の増大は、これら二つの遺伝子の発現量の変化によるものと推定された。そこで、発現量を推定するため、定量的PCR法を用いて遺伝子発現の定量を試みた。Kir 2.1 は発生期を通じて、わずかな増大を示すのに対して、Kir 2.2 は発生中期に17倍に達する発現量の飛躍的増大がみられた。したがって、ラット心筋の静止膜電位形成は主にKir 2.2の発現の増大によるものであることが明らかになった。

2・2 発生期における興奮収縮連関の形成過程

イオンチャネルは細胞表面の膜にだけ存在するのではなく、細胞小器官の膜にも存在し、様々な機能に関与している。その代表的なものが、筋小胞体に存在するカルシウム放出チャネルである。このチャネルは、L型カルシウムチャネルを介して細胞内へ流入するCa²⁺より活性化され、Ca²⁺の貯蔵部位である筋小胞体より大量のCa²⁺を細胞内に放出する。この素早い大量のCa²⁺の放出現象をCa-transientと呼んでいる(Fig. 2a)。このCa-transientがアクチンとミオシンの重合を促し、筋収縮を惹起するのである。すなわち、興奮収縮連関は二つのイオンチャネルにより調節されているのである。

Ca-transientは近年、Ca蛍光指示薬と共焦点レーザー顕微鏡により、二次元的拡がり、定量的に経時の変化を追えるようになった。そこで、我々は、麻酔学講座の協力の下に、この方法をラット心筋細胞に適用して、興奮収縮連関の発生学的変化を検討することにした¹²⁾。

Ca-transientは発生早期の胎児心筋においてすでに観察

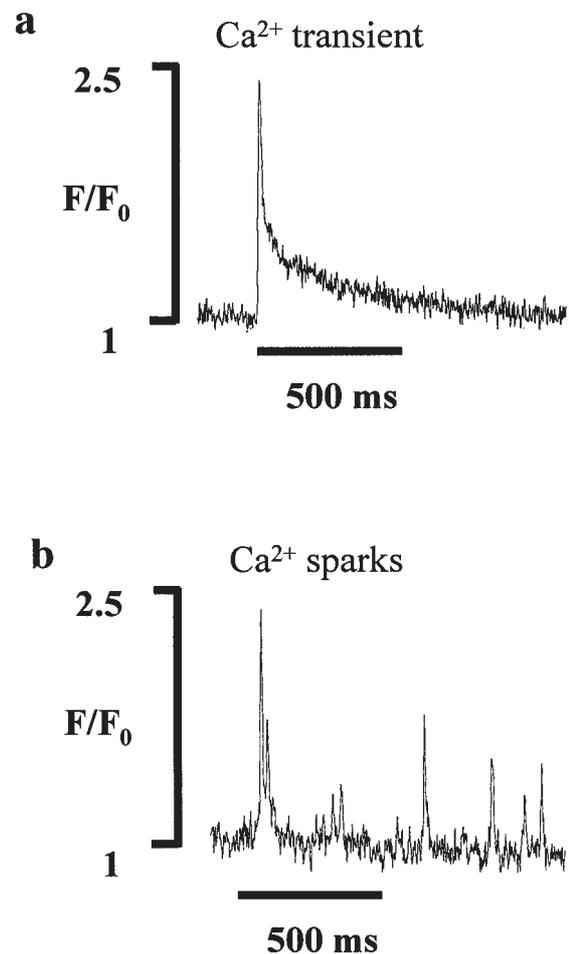


Fig. 2 Time course of Ca²⁺ signals in rat cardiomyocytes. Ordinate indicates relative intensity of fluorescence from the Ca²⁺-indicator, Fluo-3.

されたが、これはカルシウム放出チャネルの抑制薬であるryanodineで抑制されることから、筋小胞体機能は、すでに完成していると考えられた。しかし、Ca-transientの最小単位と考えられている、Ca-sparkは観察されなかった。これまで、Ca-sparkはカルシウム放出チャネルが複数個集まり、協同的開口することにより観察される最小単位のカルシウム放出であると言われてきた(Fig. 2b)。したがって、成長のあいだに、何かの契機により、それまで個々にランダムに開口していたカルシウム放出チャネルが、共同性を獲得するものであると考え、Ca-sparkが観察され始める時期を発生学的に追ってみた。すると、ラットの出生直後にCa-sparkが観察されはじめ、わずかな期間で飛躍的頻度が増大し、成体と同程度のCa-sparkが観察されるようになった。このタイミングが、横行小管の形成時期と一致したため、横行小管と筋小胞体の近接構造の形成とCa-sparkの形成の関連性が明らかとなった。現在、この近接構造形成に関するL型カルシウムチャネルの関与について、イオンチャネルの構造面から検討を加えている。

3 イオンチャネルの生理的役割の追求

近年の研究は、イオンチャネルが興奮性細胞に限らず、あらゆる細胞に分布し、細胞分裂、分泌、遊走、変形といった一般的な細胞機能に深く関わっていることを明らかにした。当教室では、こういった非興奮性細胞のイオンチャネル検索研究の一環として、整形外科学講座と共同で、関節軟骨細胞の電気生理学的特性の解析を行っている。

以前の関節軟骨に関する基礎的研究により関節軟骨細胞の電気生理学的特性が明らかとなった¹³⁾。まず、静止膜電位が-40 mV程度であったことから、ナトリウムチャネルは生理的条件下では不活性化していると考えられ、さらに活動電位の発生もないことから、ナトリウムチャネルの生理学的意義は少ないと思われた。一方、静止膜電位の形成が神経や筋細胞と同様にカリウムチャネルの貢献によるものであるとすれば、静止膜電位の値はもっと過分極側（マイナス側）にあると予想され、測定された比較的浅い膜電位との差異が問題となった。

関節軟骨細胞の静止膜電位を説明する候補は、研究で明らかになったカリウムチャネルとクロライドチャネルであるが、これらのチャネルと静止膜電位との関係を説明しなければ、関節軟骨細胞の電気生理学的特性を説明した事にはならない。そこで、このテーマを解決すべく、関節軟骨細胞の細胞膜イオン透過性の議論に立ち返って研究を行うことにした¹⁴⁾。このため、パッチクランプ法により関節軟骨細胞の膜電位を測定して膜の受動的電気特性を解析し、膜のイオン透過性を分析した。

まず、関節軟骨細胞の静止膜電位はクロライドチャネル遮断薬（SITS）の投与により脱分極するが、その際、膜コンダクタンスの減少を伴うことを観察した。さらに、細胞内および細胞外のクロライドイオン濃度を変化させると、静止膜電位はNernstの式で予測された値に変化する。これは、関節軟骨細胞の細胞膜がクロライドイオンに対する透過性を有することを示している。一方、細胞外のカリウムイオン濃度を変えても、静止膜電位は有意な変化を示さず、この細胞膜はカリウムイオンに対する透過性を有していないことが明らかとなった。したがって、クロライドイオンに対する選択的透過性を持つと考えられた。加えて、クロライド透過性をもたらすクロライドチャネルの単一チャネル活動をパッチクランプ法で記録した。その電位・時間依存性および開口動態は、-40ないし-50mVである静止膜電位を十分説明するものであった。これらの知見により、関節軟骨細胞の比較的浅い膜電位は、クロライドチャネルによるものであり、カリウムチャネルは関与していないことが明らかとなった。

4 イオンチャネルの病態生理学

これまで述べてきたように、イオンチャネルは様々な生理学的機能において重要な役割を演じている。従って、

これらイオンチャネルの変調が病態にもたらす影響は非常に大きいと考えられる。近年はイオンチャネルの遺伝子構造の検討から、イオンチャネル病なる概念も、提唱されるようになり、病態生理の検討において、イオンチャネル学は重要なアイテムとなっている。当教室では、臨床教室との共同研究により、各種病態におけるイオンチャネルの役割の解明を積極的に展開している。

4・1 致死性不整脈を引き起こす遺伝病でのイオンチャネル

心筋のイオンチャネルの変調を原因とする遺伝病としてQT延長症候群がクローズアップされてきた。すでに、QT延長症候群は5型に分類されており（LQT1-5）。そのうち、LQT3はナトリウムチャネルの遺伝子の変異であるものとされ、そのなかでも、部分欠失やpoint mutationがいくつか報告されている。東京女子医大心研小児科ではLQT3に相当する新たなpoint mutation（R1623Q）を発見し、その機能解析を、北海道大学医学部循環器内科と当教室が共同で行った¹⁵⁾。このmutationは、ナトリウムチャネルのイオン通路を形成する α サブユニットのdomain4に位置しており、電位依存性のゲート機構に関連する部位の異常であった。そこで、この遺伝子のmRNAを作成し、カエル卵母細胞に再構成させた。すると、正常遺伝子のそれと比較して、不活性化過程が遅延していることがわかった。この不活性化の遅延は、より多くの内向き電流を導き活動電位を延長させると考えられ、QT時間を延長していることを十分に説明する。さらに、single-channel recordingにより、mutantでは単一伝導度は変わっていないが、チャネルの再開が促進していることがあきらかとなった。以上の知見により、今回新たに発見された遺伝子異常は、宿主の表現型の異常（QT時間延長）を説明するものであることが分かった。

4・2 肺高血圧症における肺高血圧クリーゼの成因

肺高血圧症は、特に先天性心疾患に併発し、その進行は予後を左右する。この肺高血圧症を併発した先天性心疾患の血行再建術の術後には、肺高血圧が急激に悪化し、換気血流比が急激に低下し、危篤状態となることがしばしば経験される。そこで、当教室では、外科学第二講座と共同で、肺高血圧病態の肺動脈平滑筋細胞の特性を検討し、肺高血圧クリーゼの成因を探った¹⁶⁾。

肺高血圧モデルとしてはモノクロタリンを投与したラットを用いた。薬物投与後に肺高血圧が確立した時期に、肺動脈を摘出し、酵素処理により動脈平滑筋細胞を急性単離した。パッチクランプ法を細胞に適用して膜電流の測定を行い、イオンチャネル機能の変化の有無を検討した。肺高血圧ラットの肺動脈平滑筋細胞では、対照と比較して、外向きカリウムチャネル電流が明らかに減少していることが観察された。各種カリウムチャネル遮断薬を用いた検討から、減少しているのは、カルシウム活性化カリウムチャネルであることが明らかになった。肺動脈平滑筋の膜

電位を一義的に決定しているのは電位依存性カリウムチャネルであるが、カルシウム活性化カリウムチャネルは、脱分極の際のカルシウム流入を抑える働きがあると考えられている。したがって、肺高血圧病態でカルシウム活性化カリウムチャネルの抑制は、カルシウム流入を促進し、肺高血圧をさらに悪化させると考えられる。そこで、細胞の膜電位を測定しつつ、電位依存性カリウムチャネル抑制薬を用いて強制的に脱分極を惹起したところ、その脱分極の程度は肺高血圧ラットの細胞が対照に比較して大きかった。以上のことより、肺高血圧病態の肺動脈平滑筋ではカルシウム活性化カリウムチャネルが減少しており、自律神経や炎症物質などにより肺動脈収縮が惹起された時に、これを抑制する機構を欠いていると考えられる。肺高血圧クレーゼが発生する原因はこのカルシウム活性化カリウムチャネルの減少が重要な鍵を握っていると考えられた。

以上、イオンチャネルに関する研究の方向性を示すために、当教室での研究内容を簡単に紹介した。これらの研究のほとんどは、学内外の様々な研究室との共同研究から生まれた。当教室では心筋細胞のイオンチャネルを主な研究対象としているが、これまで述べてきたように、イオンチャネルは様々な細胞で生理的役割を演じている。従って、イオンチャネル学は病態生理を含むあらゆる医学分野に貢献する可能性を有しており、さらに学内各位との共同研究を行っていきたいと考えている。

参考文献

- Hodgkin AL, Huxley AF, Katz B. Ionic currents underlying activity in the giant axon of the squid. *Arch Sci Physiol* 1949, 3: 129-150.
- Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibers. *Nature* 1976, 260: 779-802.
- Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, Jan LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 1993, 362: 127-133.
- Ishii K, Yamagishi T, Taira N. Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K⁺ channel. *FEBS Lett* 1994, 338: 107-111.
- Takahashi N, Morishige K, Arshad J, Yamada M, Findlay I, Koyama H, Kurachi Y. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J Biol Chem* 1994, 269: 23274-23279.
- Nagashima M, Ishii K, Tohse N, Taira N, Yabu H. Unitary current through the inward rectifier K⁺ channel cloned from rabbit heart - Comparison with the native K⁺ channel. *J Mol Cell Cardiol* 1996, 28: 957-965.
- Perez-Reyes E, Castellano A, Kim HS, Bertrand P, Bagstrom E, Lacerda AE, Wei XY, Brinbaumer L. Cloning and expression of a cardiac/brain β subunit of the L-type calcium channel. *J Biol Chem* 1992, 267: 1792-1797.
- Qin N, Platano D, Olcese R, Costantin JL, Stefani E, Brinbaumer L. Unique regulatory properties of the type 2a Ca²⁺ channel β subunit caused by palmitoylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95: 4690-4695.
- Yamada Y, Nagashima M, Tsutsuura M, Kobayashi T, Seki S, Makita N, Horio Y, Tohse N. Cloning of a functional splice variant of L-type calcium channel β_2 subunit from rat heart. *J Biol Chem* 2001, 276: 47163-47170.
- Tohse N, Yokoshiki H, Sperelakis N. Developmental changes in ion channels. In: Sperelakis N editor. *Cell Physiology Sourcebook: A Molecular Approach*. 3rd ed. San Diego, Academic Press, 2001, 585-599.
- Nagashima M, Tohse N, Kimura K, Yamada Y, Fujii N, Yabu H. Alternation of inwardly rectifying background K⁺ channel during development of rat fetal cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2001, 33: 533-543.
- Seki S, Yamada Y, Tsutsuura M, Namiki A, Tohse N. Contribution of sarcoplasmic reticulum to the Ca²⁺ transient in ventricular myocytes of rat fetus. *Jpn J Physiol* 2000, 50(Suppl):S56.
- Sugimoto T, Yoshino M, Nago M, Ishii S, Yabu H. Voltage-gated ionic channels in cultured rabbit articular chondrocytes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1996, 115: 223-232.
- Tsuga K, Tohse N, Yoshino M, Sugimoto T, Yamashita T, Ishii S, Yabu H. Chloride conductance determining membrane potential of rabbit articular chondrocytes. *J Membr Biol* 2002, 185: 75-81.
- Makita N, Shirai N, Nagashima M, Matsuoka R, Yamada Y, Tohse N, Kitabatake A. A de novo missense mutation of human cardiac Na⁺ channel exhibiting novel molecular mechanisms of long QT syndrome. *FEBS Lett* 1998, 423: 5-9.
- Muraki S, Tohse N, Seki S, Nagashima M, Yamada Y, Abe T, Yabu H. Decrease in the Ca²⁺-activated K⁺ current of pulmonary arterial smooth muscle in pulmonary hypertension rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001, 364: 183-192.

別刷請求先：

〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学医学部生理学第一講座 長島雅人