

## 9133 心筋細胞のクロライドイオンチャンネルの特性とクロライド電流の生理的意義の解明

額原 嗣尚(佐賀医科大学)

心筋細胞には、catecholamine-cyclic AMP 系によって活性化されるクロライド電流 (C1 電流) が存在し、その基となっているクロライドチャンネル (C1 チャンネル) も同定されている。このチャンネルは、ほぼ膜電位非依存性であり、非常に遅い開閉キネティクスを示すことがわかっている。しかしながら、このチャンネルに対する cyclic AMP 系の制御様式の詳細についてはまだ明らかにされていない。そこで今回、チャンネル活性化における cyclic AMP の役割、すなわち cyclic AMP はチャンネルの開閉機構を制御しているのか、または単にチャンネルを available な状態に変えるのみであるのか、という点を明らかにするために実験を行った。

酵素処理によって得られたモルモット単離心室筋細胞を標本とし、2本のパッチ電極を用いて、片方の電極により whole cell clamp と細胞内灌流を行い、同時に他方の電極から cell-attached mode により単一 C1 チャンネル電流を記録した。C1 電流を活性化するため、細胞内灌流液に cyclic AMP (0.2 - 0.5 mM) を加えた。

cyclic AMP の細胞内灌流開始とともに whole cell では大きな C1 電流の発生がみられた。この時 cell-attached recording において、しばしば単一 C1 チャンネル電流の出現を観察できた。whole cell での C1 電流は、多くの場合 cyclic AMP 灌流開始後 10 - 15 分後自然に減衰したが、これに対応するチャンネル活動の減少も観察された。チャンネルの開確率を、チャンネル活動出現時から経時的に測定すると、開確率はチャンネル活動出現時においてすでに高い (0.6 - 0.9) ことが多く、また開確率はその後ほとんど変化しない。whole cell での C1 電流が漸増しているときも、チャンネルの開確率の増加は観察されなかった。一方、チャンネル電流観察中にしばしば活動チャンネルの数の増加が観測された。これは、パッチ膜直下の cyclic AMP 濃度が増加中であることを示すと考えられるが、この時開確率を推定すると、新しく活性化されたチャンネルもすでに高い開確率を持って出現していた。

以上の結果は、cyclic AMP はチャンネルの開閉キネティクスには影響を及ぼさず、燐酸化によって、unavailable な状態にあったチャンネルを available な状態に変えることによりチャンネルを活性化するという仮説を支持する。すなわち、心筋の C1 チャンネルは cyclic AMP-gated channel であって、cyclic AMP-modulated channel ではないと考えられる。



## 9133 心筋細胞のクロライドイオンチャンネルの特性とクロライド電流の生理的意義の解明

顓原 嗣尚(佐賀医科大学)

### 【研究目的】

心筋において、catecholamine-cyclic AMP 系は膜興奮、興奮収縮連関、興奮伝導などに対して生理的に重要な影響を持つ。膜の電氣的興奮に関しては、カリウムチャンネルやカルシウムチャンネルなどの陽イオンチャンネルの活動が、この系により修飾を受けることがよく知られている。最近、同じく心筋細胞において、cyclic AMP 系が陰イオン電流を誘発することが見いだされ、この電流の基となっているクロライドチャンネル（Cl チャンネル）が同定された。この心筋の Cl チャンネルは、コンダクタンスが小さく（13 pS）、膜上において低い分布密度を示す。また、チャンネルの開閉挙動はほぼ膜電位非依存性である。チャンネルの活性化には、cyclic AMP 依存性タンパクキナーゼ（PKA）が関与していることもわかってきている。

しかしながら、心筋 Cl チャンネルの開閉キネティクスの詳細や、cyclic AMP によるチャンネルの制御様式についてはまだ不明な点が多い。そこで今回、チャンネル活性化における cyclic AMP 系の役割、すなわち cyclic AMP は、チャンネルの開閉機構に影響を及ぼしてチャンネルを活性化するのか、または単に通常 unavailable な状態にあるチャンネルを、available な状態に変えることによりチャンネルを活性化するのか、という問題に的を絞って実験を行った。

クロライド電流（Cl 電流）を活性化するため、心筋細胞に対し whole cell パッチクランプにより cyclic AMP の細胞内灌流を行い、whole cell での Cl 電流をモニターしつつ、同時に別電極から cell-attached mode により単一 Cl チャンネル電流を記録した。

### 【研究方法】

標本は、collagenase 処理によって得られたモルモット単離心室筋細胞である。倒立顕微鏡下、2本のパッチ電極を用いて、片方の電極により whole cell clamp と細胞内灌流を行った。他方の電極は、cell-attached recording による単一チャンネル記録用である。

電極抵抗は、前者が 2 - 3 M $\Omega$ 、後者が 3 - 5 M $\Omega$  であった。whole cell コンダクタンスの測定は、細胞を -40 mV に電位固定し、三角波のランプパルスを印加して行った。電流電圧関係の測定には、三角波の過分極部を用いた。whole cell 電流と単一チャンネル電流は、PCM データレコーダを用いて DAT テープに記録保存し、後でコンピュータにより解析した。

正常タイロード液の組成は (mM)、NaCl 140, KCl 5.4, MgCl<sub>2</sub> 0.5, CaCl<sub>2</sub> 1.8, glucose 10, HEPES-NaOH 5 (pH 7.4) である。whole cell コンダクタンス測定時に用いた細胞外液の組成は (mM)、NaCl 140, MgCl<sub>2</sub> 2, glucose 10, HEPES-NaOH 10 (pH 7.4) であり、これに K チャンネル、Ca チャンネル、Na-K pump 電流を抑制するため、それぞれ BaCl<sub>2</sub> (2 mM)、nicardipine (1  $\mu$ M)、ouabain (10  $\mu$ M) を加えた。細胞内灌流液の組成は次の通りである (mM)。CsOH 90, aspartate 90, CsCl 30, MgCl<sub>2</sub> 2, TEA-Cl 20, EGTA 5, Tris-ATP 5, glucose 10, HEPES-CsOH 5 (pH 7.2)。Cl 電流を活性化するため、これに 0.2 - 0.5 mM の cyclic AMP を加えた。単一チャンネル記録用の電極には次の組成の液を充填した (mM)。NaCl 150, MgCl<sub>2</sub> 2, HEPES-NaOH 5 (pH 7.4)。すべて実験は 35  $\pm$  1  $^{\circ}$ C で行った。

## 【研究結果】

### 1. 細胞内 cyclic AMP による Cl 電流の活性化

上記の細胞内および外液を用いた実験条件は、whole cell clamp において細胞膜の background コンダクタンスを観測するのに適している。今回は細胞内液に cyclic AMP が含まれているので、Cl 電流の活性化が期待される。Fig. 1 に示す実験はこれを証明したものである。細胞内灌流を開始すると細胞は大きな膜コンダクタンスを示した。細胞外の Cl イオンの大部分を aspartate イオンで置き換えると、Fig. 1A と B に示されるように外向き電流が大きく減少し、さらに Cl チャンネルの阻害剤である anthrathene-9-carboxylic acid (9AC) を作用させると、内向き電流の減少がみられる。

whole cell での Cl 電流の大きさは、多くの場合灌流開始後 10 - 15 分間安定しており、その後自然に減少した (run-down, Fig. 1A)。Fig. 1C にはその run-down のようすを電流電圧関係で示してあるが、inset に示すように、減少した電流成分はおおよそ -30 mV に逆転電位を持ち、また外向き整流性を示し、Cl 電流の特徴をよく表している。

Cl 電流の発生を示している細胞において、cell-attached mode で Cl チャンネル電流をしばしば記録できた。しかしその成功率は低く、しかも多チャンネル記録を示すものが多かった。記録中の Cl チャンネルも run-down を起こすことが観察された。それを Fig. 2 に示す。Fig. 2A の記録は細胞内灌流初期に得られたものであるが、振幅ヒストグラムからもわかるように少なくとも 3 個のチャンネルの活動が見られる。Fig. 2B はさ

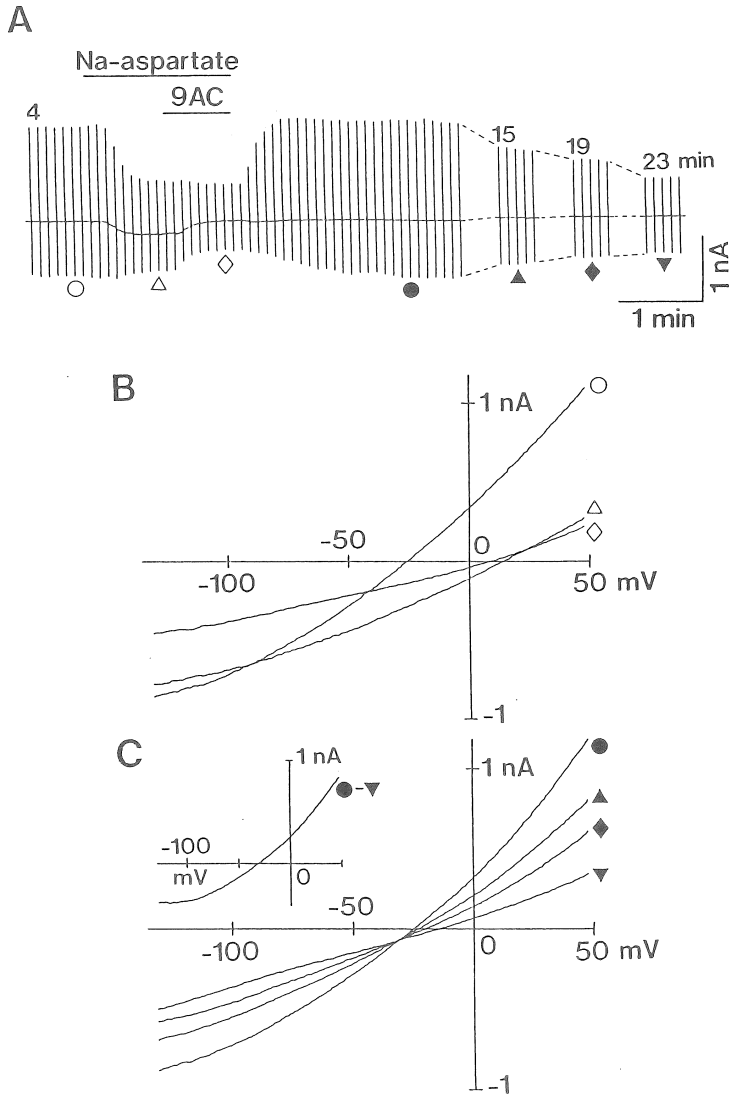


Fig. 1. Whole cell  $\text{Cl}^-$  current recorded in a ventricular myocyte dialysed with an internal solution containing 0.5 mM cyclic AMP. A, chart record of membrane current. Holding potential was set at -40 mV and ramp pulses were applied every 6 s. The bath solution was changed from  $\text{Cl}^-$ -rich to low- $\text{Cl}^-$ , aspartate-rich (Na-aspartate) solution for the time indicated by bar, and anthracene-9-carboxylic acid (9AC, 2 mM) was further added to the bath (bar). Numbers above the traces indicate the time (in min) which elapsed after the beginning of cell dialysis. Current traces indicated by the symbols are the sources for I-V relations shown in B and C. B, I-V relations obtained in control solution (○) and in Na-aspartate solution before (△) and after (◇) addition of 9AC. C, run-down of  $\text{Cl}^-$  current. I-V relations obtained 9 min (●), 15 min (▲), 19 min (◆), and 23 min (▼) after the beginning of cell dialysis are shown. Inset shows difference current (●-▼) obtained by subtracting late I-V relation from early I-V relation.

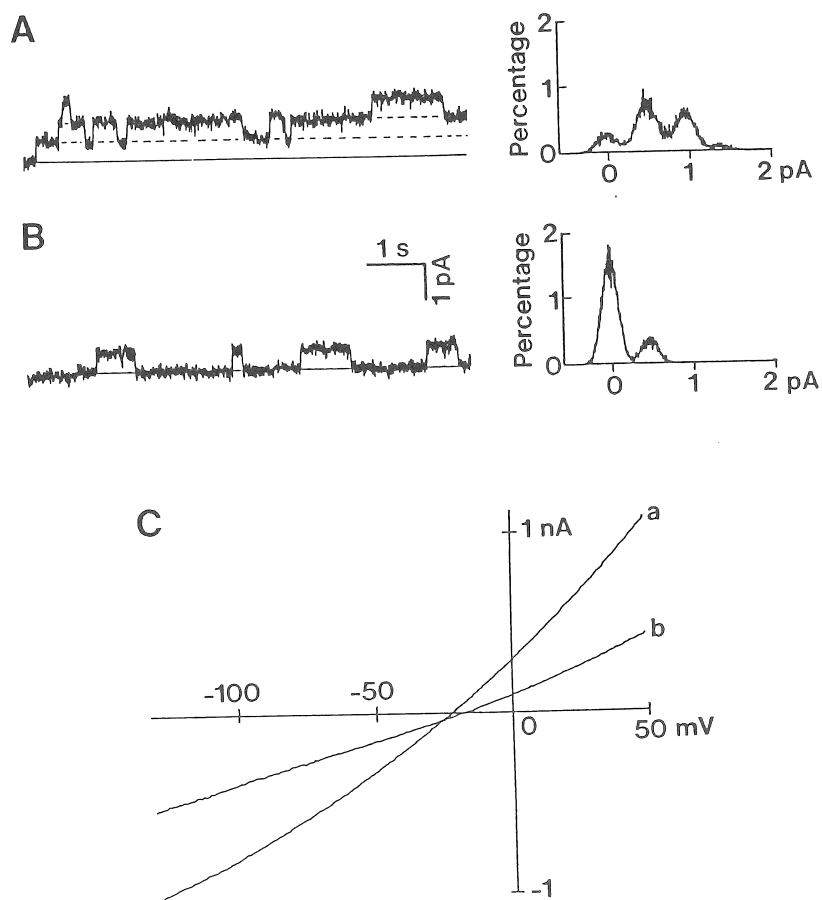


Fig. 2. Run-down of single  $\text{Cl}^-$  channel. A and B, trace of  $\text{Cl}^-$  channel currents and amplitude histogram obtained from the same one patch at early and late stage (about 5 and 14 min after beginning of cell dialysis) of experiment, respectively. The patch membrane potential was held at +50 mV. The whole cell pipette contained 0.5 mM cyclic AMP. Amplitude histograms were constructed from data sampled for 1 min. C shows I-V relations of whole cell current observed at the times when each of the records in A and B was obtained (a and b).

らに 10 分後に得られた記録であるが、ここではチャンネルは 1 個となっている。以下実験はこの run-down に注意しつつ行った。

## 2. チャンネル活性化における cyclic AMP の役割

cyclic AMP の細胞内灌流中に、Cl チャンネル活動がどのように出現し、以後どのように変化するかを見るため、以下の実験では、単一チャンネル記録の準備が完了した後に cyclic AMP の灌流を開始した。すなわち、チャンネル開確率の初期値とその後の経時的変化を知るのが目的である。Fig. 3 にその実験の 1 例を示す。この例では、灌流開始後約 4 分目にチャンネル活動がパッチ膜に出現し、その活動は数分以上持続した。一時期（Fig. 3A に b で示す）、活動チャンネル数が増えたようである。チャンネル開確率の経時の変化を知るため、連続して 20 秒ごとに 15 秒間のパッチ膜電流のデータをサンプルし、それぞれの時期毎に振幅ヒストグラムを作成した。Fig. 3B に示すヒストグラムは、それぞれ Fig. 3A に a と b で示されている時間に得られたものである。Fig. 3Ba をみると、第 3 の電流レベルの振幅が最も大きく、第 4 のレベルにはチャンネル現象がない。このようなヒストグラムの形状は、チャンネルの数が 3 個であったことを示す。同様に、Fig. 3B の b ではチャンネルの数は 4 個と考えられる。さらに、このような多チャンネル記録において、個々のチャンネルが同一の開確率を持っていると仮定して、ヒストグラムから開確率を計算した。

Fig. 4 に、Fig. 3 で示した実験で観察されたチャンネル開確率の時間経過を示す。このグラフには、whole cell コンダクタンスおよび平均パッチ膜電流の時間経過も示されている。whole cell コンダクタンスは時間とともにいくらか増加しているが、これは cyclic AMP が、より充分に細胞内に浸透していく経過を反映すると考えられる。一方チャンネル開確率は、活動出現時にすでに高いが（約 0.6）、開確率は実験経過中大きな変化を示さず、ほぼ 0.8 付近にあったといえることができる。同じような所見は、他の数例の実験においても確認された。すなわち、チャンネル活動出現時に開確率は一般に高い。また低い（0.4 - 0.5）場合でも、細胞内灌流の進行とともにそれが増加する例は決して観察されなかった。

また、チャンネル活動観察中にしばしばチャンネルの数が増えることがあったが、このような時も平均の開確率は変化していないようである（Fig. 4 に横線で示す）。別の実験でこの点についてさらに詳しく解析してみた。Fig. 5 に示す実験では、電流トレースは始め 2 段の変化を示していたが、矢印の時点から 3 段の変化を示すようになった。この時点の前後のチャンネル開確率を推定するため、この時点前後 1 分間の電流データをサンプルし、振幅ヒストグラムを作成した（Fig. 5B, C）。個々のチャンネルが同じある開確率を持っていると仮定して、2 項分布の式を応用し、それぞれの電流レベルがヒストグラム上で示すべき振幅を計算した。Fig. 5B で、矢印は、開確率が 0.68 でチャンネル数が 2

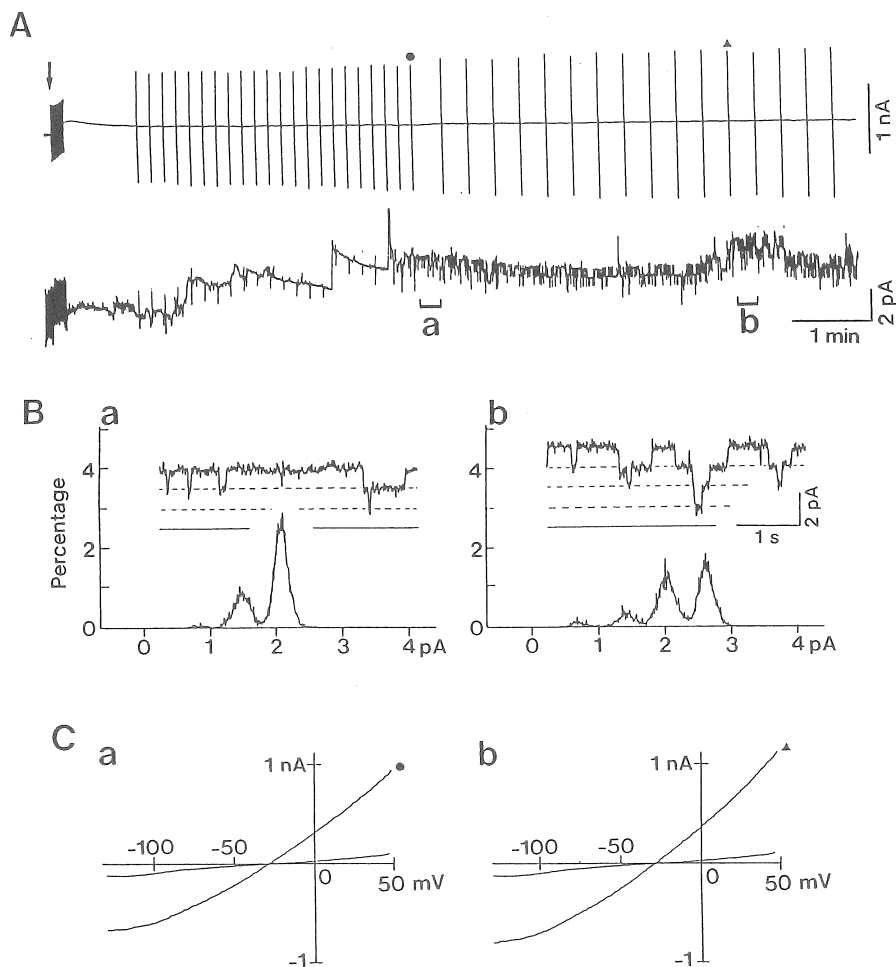


Fig. 3. A, simultaneous chart recordings of whole cell current (upper trace) and current through a patch membrane (lower trace) obtained during dialysis of the cell with 0.5 mM cyclic AMP. The cell-attached patch membrane was clamped at +50 mV throughout. At arrow, cell dialysis was begun by rapturing the membrane beneath the whole-cell pipette. The thick vertical deflections of current trace seen at the beginning are artifacts produced by resistance-monitoring pulses. About 1 min after this moment, monitoring of the whole cell conductance was begun by applying ramp pulses every 6 s (thin vertical deflections of whole cell current). The pulse interval was increased to 20 s later. About 4.5 min after the onset of cell dialysis, activity of single Cl<sup>-</sup> channels appeared in the patch recording. Large fluctuations of the patch current seen before this instance are artifacts of unknown nature. Ba and b, amplitude histograms of channel currents obtained during the time periods indicated by a and b in A. Number of active channels was three in a and it increased to four in b. Inset shows the original current traces. Ca and b, I-V relation of whole cell current obtained from the current traces indicated by the symbols in A (● and ▲). I-V relation observed after run-down of the Cl<sup>-</sup> current is also drawn in both graphs.



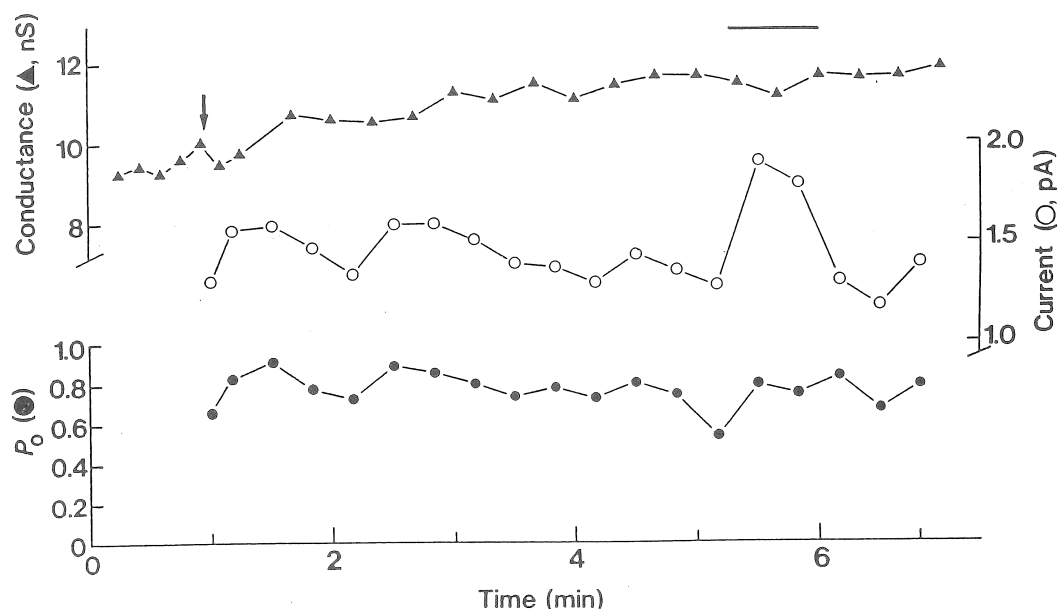


Fig. 4. Time course of whole cell conductance (upper curve, ▲), mean patch current (middle curve, ○) and open probability of single  $\text{Cl}^-$  channel ( $P_o$ , lower curve, ●) during the course of experiment shown in Fig. 3. Time 0 corresponds to the time point 3.5 min after the beginning of cell dialysis, and at arrow activity of single channels appeared in the patch. Number of active channels shortly increased from 3 to 4 during the period indicated by bar. Whole cell conductance was calculated from the whole cell I-V relation at -30 mV, a voltage near the reversal potential of  $\text{Cl}^-$  current. Mean patch current and  $P_o$  were calculated from the amplitude histograms which were obtained from the data periodically sampled for 15 s during the experiment. For calculation of  $P_o$  it was assumed that every channel in the multichannel recordings had the same  $P_o$ .

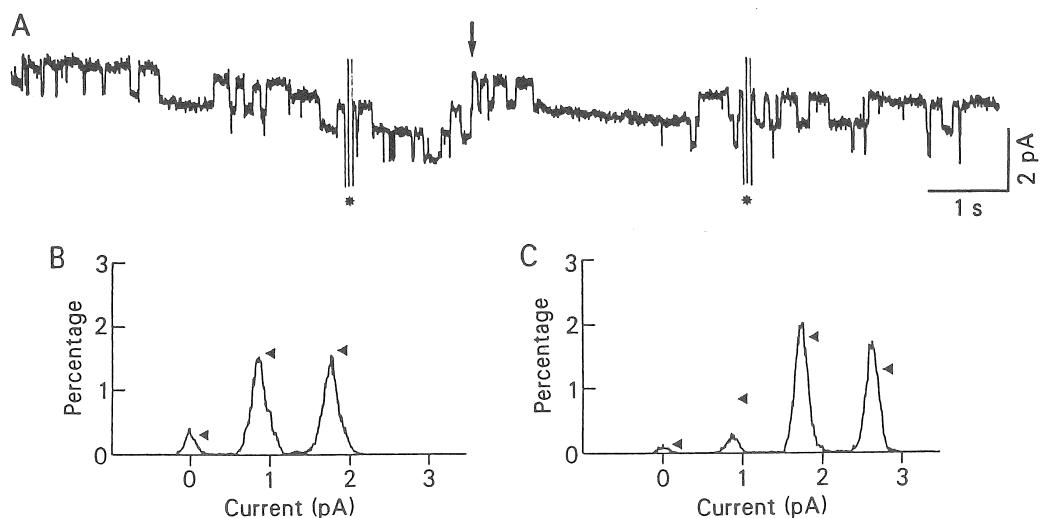


Fig. 5. Patch recording showing an increase in the number of active channels. A, original record of channel currents at a membrane potential of +50 mV. The current trace initially showed two-step change, and at arrow it began to show three-step change. Before this instance the two-step change had been recorded for about 2 min. The cell was dialysed with cyclic AMP (0.25 mM)-containing solution. The vertical deflections denoted by \* are artifacts due to ramp pulses imposed to the whole cell. Current trace shows a slow, negative drift. B and C, amplitude histogram obtained from the data sampled for 1 min, immediately before and after the increase in channel number (arrow in A), respectively. Arrow heads indicate relative level of the probability that each of the three (B) and four (C) current levels should occupy, according to a binomial analysis with an assumption that each channel has  $P_o$  of 0.68. Note: the relative height of each peak, instead of the area underlying the curve in the histogram (B), was used for calculation.

であると仮定したときの振幅の期待値を示す。実験データと期待値はよく一致している。一方、Fig. 5C では、開確率を同じ 0.68 とし、チャンネル数を3として計算した振幅の期待値（矢印）は、データと一致しなかった。この不一致の態様、すなわち期待値とデータのずれの様子は、むしろ新しく活動を始めた第3のチャンネルは、0.68 より大きい開確率を持っていたことを示唆する。

### 3. 結論

以上、Cl チャンネルは cyclic AMP によって活性化されると、全か無かの法則に従うかのごとく高い開確率を示すようである。Cl チャンネルは、活性化の程度に依存して段階的に変わるような開確率を示すことはない。cyclic AMP のチャンネル活性化における主たる役割は、活動性チャンネルの数を制御することであろう。チャンネルの開閉キネティクス、従ってまた開確率は、チャンネル自体の性質によって規定されているのであろう。

#### 【考察】

cyclic AMP の細胞内灌流中にパッチ膜に出現した Cl チャンネルは、始めから高い開確率を持ち、その後灌流の進行に従って活動チャンネル数が増えることはあっても、明らかに開確率が増加するようなことはなかった。この所見から、我々は上記のような結論を得た。

ここで問題となるのは、チャンネル観察中のパッチ膜直下の cyclic AMP ないし PKA の濃度であろう。今回の実験では、細胞内灌流液は非常に高い濃度（0.2 - 0.5 mM）の cyclic AMP を含んでおり、チャンネル開確率が cyclic AMP 濃度依存性を持っていた場合でも、膜直下の濃度が急速に飽和濃度に達したために、段階的な開確率変化を観察できなかった可能性もある。whole cell での Cl コンダクタンスが増加中であっても、パッチ膜直下でもやはり cyclic AMP 濃度が飽和濃度以下で増加中である、ということにはならないであろう。しかしこのことはまた、パッチ膜下の薬物濃度が飽和濃度以下で漸増中である場合も、必ずやあるに違いないことをも意味する。それにもかかわらず今回の実験では、開確率が漸増するようなチャンネル活動は、決してみられなかった。また、観察途中で活動性チャンネルの数が増える例が少なからず見られたが、このような場合、膜直下の cyclic AMP 濃度は飽和濃度に決して達してはおらず、むしろ閾値濃度付近で増加中であったと考えて良いのではなかろうか。にもかかわらず、“新チャンネル”は高い開確率をもって出現していた。これらの所見は、我々の結論を支持するものと考えられる。

心筋においては、Ca チャンネルおよび K チャンネルが、cyclic AMP によりその活動性を増すことが知られている。K チャンネルについての研究は詳細には行われていないが、

Ca チャンネルについては、cyclic AMP 系は個々のチャンネルの開確率を増加させると考えられている。もともと開確率が低いことを考慮しても、catecholamine や cyclic AMP によって、活動性 Ca チャンネルの数が増えることを、単一チャンネルレベルで観察したという報告は今までに無いのである。この意味において、cyclic AMP によるチャンネル制御様式は、少なくとも Cl チャンネルと Ca チャンネルとで異なるといえるのではなかろうか。我々の結論が正しいとすると、心筋の Cl チャンネルは一種の cyclic AMP-gated channel であり、Ca チャンネルのような cyclic AMP-modulated channel ではないといえる。

#### 【今後の課題】

今回の実験では、cyclic AMP の細胞内灌流による Cl チャンネルの活性化という方法をとったため、パッチ膜直下の cyclic AMP 濃度がどうなっているのかという点において、やはり曖昧なところが残されており、我々の結論は直接に証明されるには至っていない。今後は inside-out mode のチャンネル記録を試みて、膜直下の cyclic AMP ないし PKA 濃度を正確にコントロールしながら、さらに研究を進める必要があろう。

今回は、チャンネル制御における cyclic AMP 系の役割に的を絞って実験を行ったが、心筋の Cl チャンネルについては、その開閉機構や、内向き電流のバーストのメカニズム、外向き整流性の原因など、まだ不明な点が多く残されている。これらの点について、今後さらに実験していきたいと考えている。

	研 究 の 発 表
論文	<p>1. 誌名: Circulation Research (70)851-855  時期: 1992年4月  題名: Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells.</p>
学会	<p>1. 学会名: Japan-UK Symposium on Background Conductance Mechanisms in Cardiac Muscle (Oxford)  時期: 1991年7月  題名: Single channel study of cyclic AMP-dependent cardiac chloride current.</p>
	<p>2. 学会名: Cambridge Meet. Physiol. Soc. (Cambridge)  時期: 1991年7月  題名: Two ionic conductances activated by extracellularly applied ATP in guinea-pig atrial cells.</p>
	<p>3. 学会名: 第42回西日本生理学会総会  時期: 1991年11月  題名: 心筋細胞におけるプリン受容体を介して活性化される電流系について.</p>
	<p>4. 学会名: 第69回日本生理学会大会  時期: 1992年4月  題名: 心筋クロライドチャネルの cyclic AMP による制御機構.</p>
	<p>5. 学会名: 第69回日本生理学会大会  時期: 1992年4月  題名: 心筋細胞におけるプリン受容体を介して活性化される電流系について.</p>

ON THE MECHANISM OF REGULATION BY CYCLIC AMP OF  
CARDIAC CHLORIDE CHANNEL

TSUGUHISA EHARA and HIROSHI MATSUURA

Department of Physiology, Saga Medical School

Summary

Using the double patch method, single  $\text{Cl}^-$  channel currents were recorded from guinea-pig ventricular myocytes in cell-attached mode. The cells were dialyzed through a second patch pipette with cyclic AMP (0.1 - 0.5 mM)-containing medium. With progression of the cell dialysis, appearance of the  $\text{Cl}^-$  channel activity could be observed in the on-cell patches. At the time of its appearance, the  $\text{Cl}^-$  channel activity showed an already high ( $>0.5$ ) open probability ( $P_o$ ), and the  $P_o$  value did not further increase thereafter even when the whole cell  $\text{Cl}^-$  current was increasing with time. In some patches, an increase in the number of active channels was observed during the cell dialysis. In such cases, the newly activated channel also seemed to have a high  $P_o$ . Channel activity showing a low ( $<0.4$ )  $P_o$  at the beginning of its appearance was never observed. These results suggest that the cyclic AMP system, by phosphorylation, creates an available state of the channel without influencing its kinetic behavior. Thus cyclic AMP appears to gate the cardiac  $\text{Cl}^-$  channel, that intrinsically possesses a high  $P_o$ .