

9242 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

助成研究者: 顕原 嗣尚(佐賀医科大学 医学部)

共同研究者: 松浦 博(佐賀医科大学)

1. 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チャンネル(Cl⁻チャンネル)が存在するが、チャンネル記録の困難さ(チャンネル密度が非常に低い)を一因として、チャンネルの開閉挙動の詳細な解析はまだなされていない。そこで今回、単一 Cl⁻チャンネル電流のデータの集積を試み、開閉動力学の解析を行った。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 Cl⁻チャンネル電流を記録した。Cl⁻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。他方、cyclic AMP を負荷した細胞から得た outside-out 膜からも Cl⁻チャンネルを記録できることがわかったので、この手法をも利用し、次のような結果を得た。Cl⁻チャンネルは少なくとも一種類の開状態と二種類の閉状態のあいだを確率論的に遷移する。平均開時間と遅い方の平均閉時間はともに約 1 s、速い方の平均閉時間は約 0.2 s である。これらのパラメータに明らかな膜電位依存性はない。膜内外の Cl⁻濃度が対称的であるときもチャンネル電流は外向き整流性を示す。すなわち整流性はチャンネルの特性である。outside-out 膜からの記録では、内向き電流にバーストがみられない。すなわち cell-attached recording でみられる内向き電流のバーストは、何らかの細胞内物質によるブロック現象を反映すると考えられる。

2. whole cell clamp 実験で ATP も Cl⁻電流を活性化することが見いだされた。この反応は心室細胞より心房細胞により多くみられたので、主として心房細胞で反応の解析を行った。すなわち、細胞に μ M レベルの ATP を作用させると、すでに報告されているようにまず一過性で内向きの非選択性陽イオン電流が発生するが、それに引き続いて徐々に膜コンダクタンスが上昇してくる。この ATP 誘発電流は外向き整流性を示し、その逆転電位は外液 Cl⁻濃度の変化とともに Nernst 式の様式で変化した。非水解性の ATP analogue である ATP γ S も同様の反応を起こしたので、プリン受容体を介するコンダクタンス変化であると結論された。ATP のほか、ADP、AMP、adenosine も Cl⁻電流誘発に有効であった。いっぽうこれら四者の薬物それぞれの用量作用関係には有意の差がなく、したがってプリン受容体の subtype (P₁、P₂) のうちどちらがこの反応に関与しているかは決定できなかった。高濃度の EGTA または BAPTA を細胞内に負荷した条件下でも ATP 反応は観察されたので、プリン受容体刺激以後の細胞内情報伝達に Ca²⁺ の関与はないと考えられた。

9242 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

助成研究者: 顕原 嗣尚(佐賀医科大学 医学部)

共同研究者: 松浦 博(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、KチャンネルやCa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。われわれは、従来からこの心筋のClチャンネルに関する研究を行ってきたが、その結果、心筋Clチャンネルは、コンダクタンスが小さい(13 pS)こと、膜上において低い分布密度を示すこと、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)を介するリン酸化が必要であること、またそのリン酸化は、非活動状態にあるチャンネルをavailableな状態に変換するが、チャンネル自身の開閉動力学には影響しないこと、などを明らかにしてきた。

しかしながら、心筋Clチャンネルに関してはまだ不明な点も多く残されている。とくに、チャンネルの開閉動力学の詳細な解析はまだなされておらず、また、catecholamine-cyclic AMP系以外にも調節系が存在するかどうかの点も不明である。そこで今回は、これらの点を明らかにすることを目的として実験を行った。

【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ならびに心房筋細胞である。単一チャンネル記録は心室筋細胞で行った。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およびcyclic AMPの細胞内灌流を行い、他方の電極でcell-attached recordingを行った。電極抵抗は、前者が1-2 M Ω 、後者が3-5 M Ω であった。一部の実験ではoutside-out法によるチャンネル記録も試みた。ATP関連物質のwhole cellコンダクタンスにおよぼす影響をみた実験は、心房筋

細胞を whole cell clamp して行った。すなわち、心房細胞を -40 mV に電位固定し、三角波のランプパルスを印加して電流電圧関係を測定した。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, $MgCl_2$ 0.5, $CaCl_2$ 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, $MgCl_2$ 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 $BaCl_2$ (2 mM)、nicardipine (1 μ M)、ouabain (10 μ 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, $MgCl_2$ 2, TEA-Cl 20, EGTA 5, Tris-ATP 5, glucose 10, HEPES-CsOH 5 (pH 7.2)。Cl 電流を活性化するときには、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, $MgCl_2$ 2, HEPES-NaOH 5 (pH 7.4)。outside-out 法によるチャンネル記録時は、細胞外を正常タイロード液とした。すべて実験は 35 ± 1 °C で行った。

【研究結果】

1. outside-out 法による Cl チャンネル記録

whole cell clamp 用の電極により細胞に cyclic AMP を負荷しつつもう一本の電極で cell-attached mode によるチャンネル記録を行い、若干のデータを得ることができた。また、cyclic AMP を負荷した細胞から得た outside-out のパッチ膜からもチャンネルを記録できることが判明したので、この方法によりさらにチャンネルデータの集積を試みた。Fig. 1 に outside-out 膜で観察された Cl チャンネル電流とその電流電圧関係の一例を示す。膜内外の Cl 濃度はこの場合ほぼ等しい (約 150 mM) ので、チャンネル電流の逆転電位は 0 mV に近い値となっている。しかし電流電圧関係には弱いながらも外向き整流性がみられた。このことは、チャンネルの外向き整流性は Cl イオンの濃度勾配に依存して発生しているのではなく、チャンネルタンパク自身の性質に由来していることを示唆する。なお、この条件下での単一チャンネルコンダクタンスは外向き電流で 15 pS (5 例平均) で、cell-attached recording で得られた値よりもやや大きかった。

outside-out 膜で観察されたチャンネルのもう一つの特徴は、内向き電流にバーストがみられないことである。cell-attached recording では内向き電流に必ずバーストがみられた。このことは、intact な膜では細胞内の何らかの物質がチャンネルブロッカーとしてバーストの原因になっている可能性を示唆する。

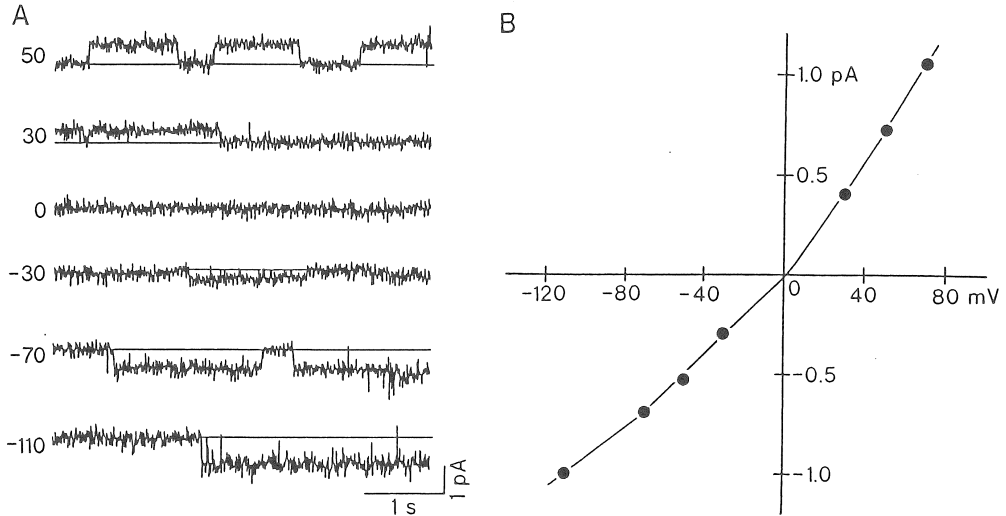


Fig. 1. Cl^- channel current observed in an outside-out patch. The patch was excised from a cyclic AMP-loaded cell in normal Tyrode solution. The cell had been dialysed with solution containing 0.25 mM cyclic AMP. Pipette solution was the usual one mainly composed of 150 mM NaCl, thus providing an almost symmetrical distribution of Cl^- ions across the membrane. A, original current traces filtered at 0.5 kHz. Numbers at the left of each trace are the patch membrane potential. B, I-V relation of the channel current shown in A. Note a slight outward rectification. Linear part of the outward current has a slope of 16 pS.

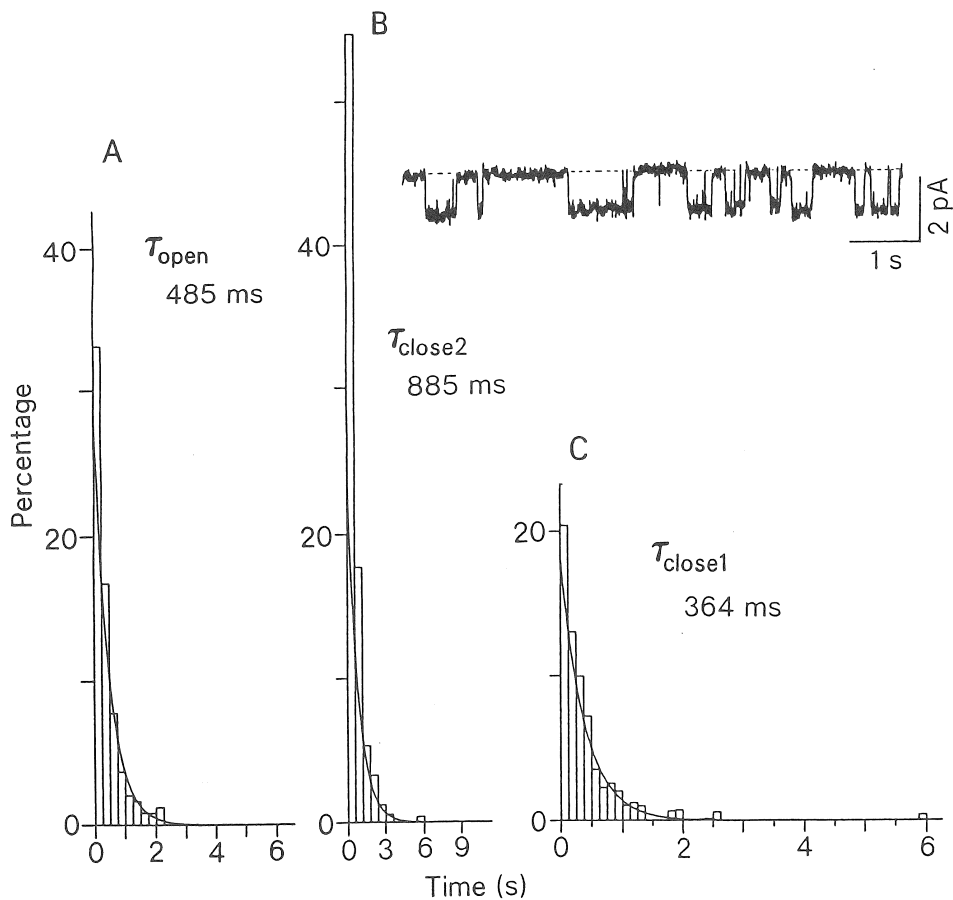


Fig. 2. Kinetic analysis of Cl^- channel. Data were obtained from an outside-out patch which was clamped at -80 mV, and 256 events were analysed. The experimental conditions were the same as in Fig. 6. A, histogram of open time. Time bins are 250 ms. The histogram was fitted to a single exponential with a time constant (τ_{open}) of 485 ms. B and C, histograms of closed time. Time bins are 600 ms for B and 125 ms for C. τ_{close1} and τ_{close2} are the time constants for the fast and slow components of closed time. Inset shows original current trace filtered at 0.2 kHz.

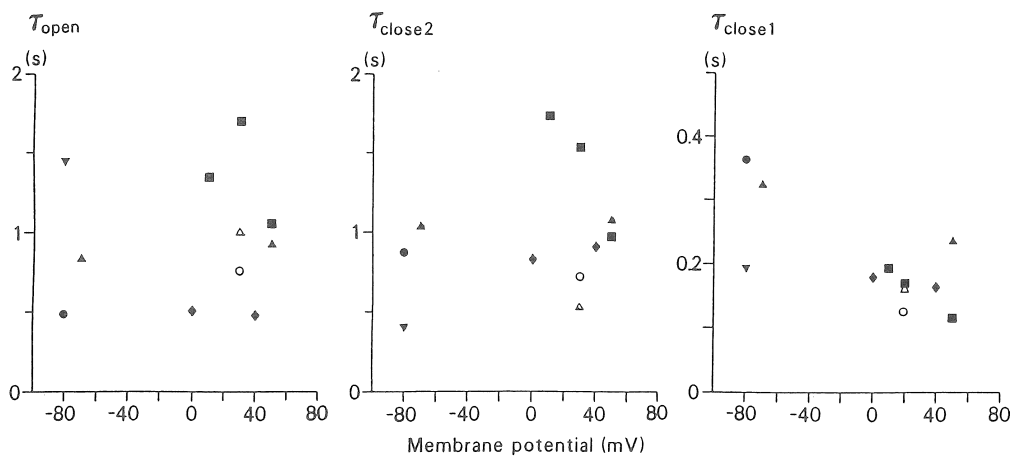


Fig. 3. Time constants of open-close kinetics as a function of membrane potential. τ_{open} , time constant of open time. τ_{close1} and τ_{close2} , time constant for the fast and slow component of closed time, respectively. Data from 5 outside-out patches (closed symbols) and 2 cell-attached patches (open symbols) are plotted.

2. チャンネルの開閉動力学の解析

Fig. 2 にチャンネルの開閉挙動の解析結果の一例を示す。これは outside-out 膜において膜電位 -80 mV でみられたチャンネル電流を解析したものである。開時間ヒストグラムは単一の指数関数でフィットでき、その時定数は 485 ms であった。閉時間ヒストグラムは単一の指数関数ではフィットできず、少なくとも二つの要素を持っているようであった(時定数 364 および 885 ms)。このような解析をいくつかの例においてさまざまな膜電位で行い、その結果をまとめたのが Fig. 3 である。示されたデータの中には、cell-attached recording と inside-out 膜から得られたものの両方が含まれている。Fig. 3 をみると、データのばらつきがかなり大きいものの、三つの時定数ともはっきりした膜電位との相関を示していない。結局、チャンネルの開時間の時定数と閉時間の遅い方の時定数はともに約 1 s で、閉時間の速い方の時定数は約 0.2 s であり、それらはおおむね膜電位非依存性であると結論される。

3. プリン受容体を介した Cl 電流の活性化

心筋クロライド電流は、アドレナリン性 β 受容体のみならずプリン受容体を介しても活性化されることが見いだされた。この現象は心室筋細胞よりも心房筋細胞において多くみられたので、実験は主として心房細胞に対して行った。Fig. 4 に示す実験は、 50 μ M の ATP の膜コンダクタンスに及ぼす影響をみたものである。心房筋細胞に ATP を作用させると、まず一過性の内向き電流の発生があり、その後続いて内向き及び外向き電流の漸増がみられる。一過性に発生した内向き電流は、強い内向き整流特性を持ち、外向き成分がほとんどみられないが (Fig. 4C)、これはすでに報告にあるごとく ATP によって活性化され、すぐに脱感作を起こす非選択性陽イオンチャンネル電流である。

ATP 作用後比較的ゆっくりと活性化される電流は外向き整流性を示し、その逆転電位はおよそ -30 mV 付近にあった (Fig. 4E)。これらの特性は、cyclic AMP-PKA 系によって活性化される Cl 電流のそれによく似ている。そこでいろいろな細胞外 Cl 濃度のもとでこの ATP 誘発電流の逆転電位を調べてみた。Fig. 5A に示す実験では、ATP 作用中に細胞外 Cl 濃度を 148 mM から 18 mM に減少させている。Cl 濃度減少とともに保持電流が内向きにシフトし、ランプ波中の外向き電流が大きく減少している (Fig. 5A)。また、ATP 誘発電流の逆転電位は、高 Cl 液中で -26 mV であったものが低 Cl 液中で $+20$ mV に変化した (Fig. 5C)。Fig. 5D は、三種の異なった Cl 濃度のもとで測定された逆転電位についてのデータをまとめたものである。逆転電位と Cl 濃度 (対数) との関係は直線的で、その勾配は Cl 濃度の十倍変化あたり 52.6 mV を示した。この結果は、この電流の主たる電荷運搬イオンは Cl イオンであることを示す。

細胞外 ATP が膜外の ecto-MgATPase によって加水分解されるとき、ATP 受容体を介することなく何らかの機転で膜コンダクタンスを変化させるとの報告がある。そこで水解を

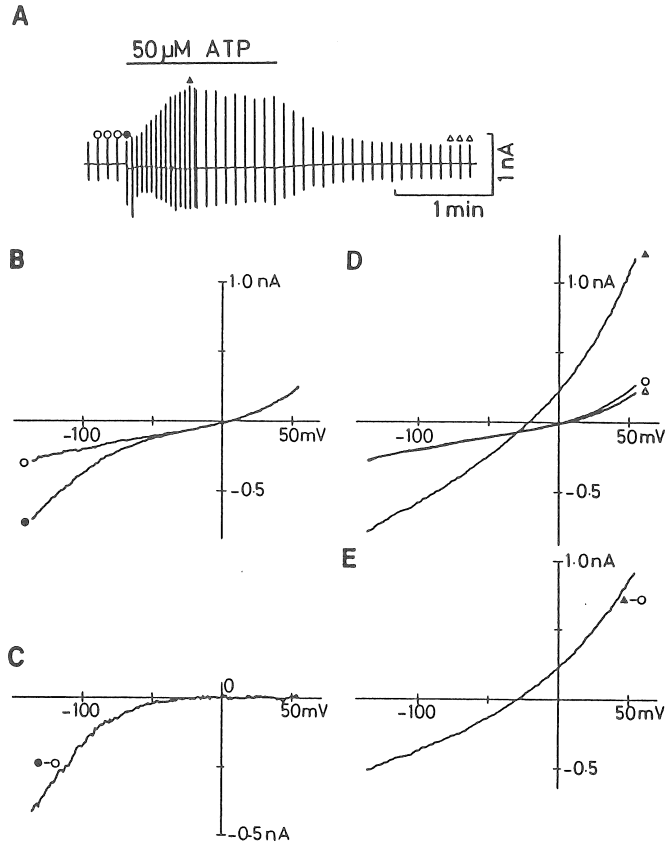


Fig. 4. Membrane current responses of atrial cells to extracellular application of ATP. A, Chart recording of the membrane current in response to voltage ramp. The cell was exposed to 50M ATP for a period indicated by bar. B, I-V relations obtained before (○) and 2 sec after (●) the application of ATP. In this and subsequent similar figures, the current traces indicated by the same symbols in the chart record are superimposed in the graph. C, I-V relation of ATP-activated transient current obtained by subtracting control I-V relation from I-V relation with ATP shown in B. D, I-V relations obtained before (○) and 40 sec after (▲) the application of ATP. Recovery I-V relation (△) is also shown. E, I-V relation of ATP-activated, maintained current obtained by subtraction.

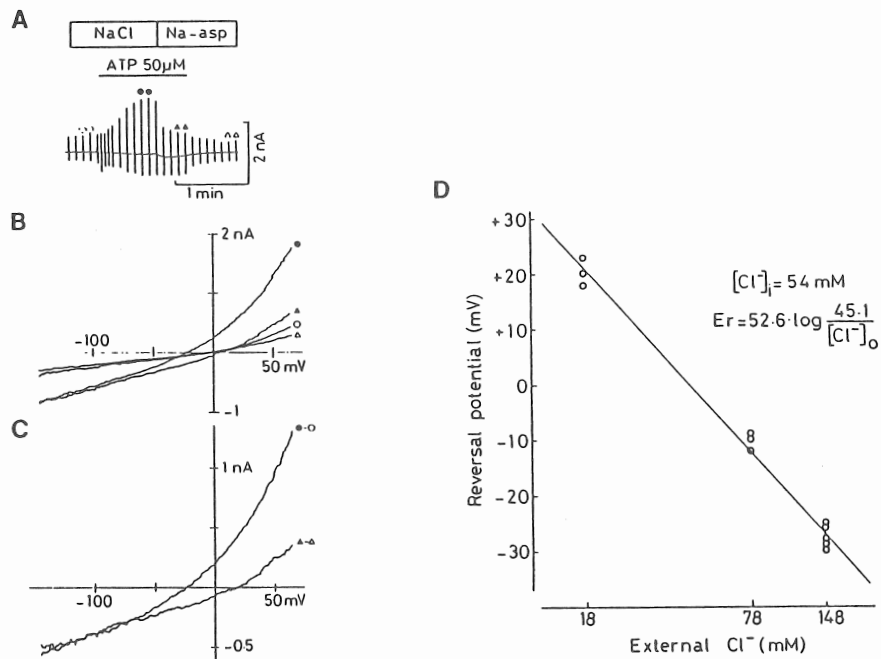


Fig. 5. Dependence of the reversal potential of ATP-induced current on $[Cl^-]_o$. A, Chart record of the membrane current in response to ramp pulses. ATP ($50 \mu M$) was first applied to the cell in NaCl ($Cl^- = 148 \text{ mM}$) solution, and then external solution was changed to Na aspartate (Na-asp, $Cl^- = 18 \text{ mM}$) solution when the background conductance was increased by ATP. Finally ATP was washed off. B, I-V relations recorded in Na aspartate or NaCl solution, in the absence and presence of ATP. Averages of each two consecutive I-V relations indicated by the symbols in A are shown with the same symbol. ○ control in NaCl solution; ● and ▲, during ATP application in NaCl and Na-aspartate solution, respectively; △, after ATP was washed off in Na-aspartate solution. C, I-V relations of the ATP-induced current (difference current) recorded in NaCl solution (●-○) and Na aspartate solution (▲-△). D, Relationship between the reversal potential of ATP-induced current and external Cl^- concentration ($[Cl^-]_o$) obtained with internal solution containing $54 \text{ mM } Cl^-$. The linear line was fitted to the data according to regression analysis with the least-square method, and had a slope of 52.6 mV per tenfold change in $[Cl^-]_o$.

受けにくい ATP アナログである ATP γ S を細胞に作用させてみたところ、ATP でみられた反応とまったく同じ反応が観察された。したがって、この反応はやはり ATP 受容体 (プリン受容体) を介して起こっているものであると結論される。

4. プリン受容体のサブタイプについて

観察された ATP 応答にプリン受容体が介在しているとすれば、他の ATP アナログによっても反応が多かれ少なかれ起こるはずである。もちろん関与するプリン受容体のサブタイプが問題となる。そこで ADP、AMP、adenosine などの作用を ATP のそれと比較検討した。ADP は ATP とまったく同様の作用を示したが、AMP と adenosine は Cl 電流のみを誘発し、急速に脱感作される内向き電流は発生させなかった。したがって、後者の電流にはいわゆる P_2 タイプのプリン受容体が関与しているものと考えられる。他の細胞においても P_2 プリン受容体が一過性の陽イオン電流を発生させることが報告されている。

いっぽう Cl 電流の活性化に関して、ATP、ADP、AMP、adenosine の作用の強さを比較するため、それぞれの薬物の用量作用関係を調べてみたが、今回の実験では四者のあいだに有意な差を見いだせなかった。すなわち P_1 、 P_2 などのどのプリン受容体サブタイプがこの反応に関与しているかを決定することはできなかった。

【考察】

1. 今回、cell-attached recording ならびに outside-out 法を利用して、単一 Cl チャンネル電流のデータを集積し、それらのデータからチャンネルの開閉動力学に関するパラメーターをはじめ決定できた。それによれば、心筋 Cl チャンネルは一種類の開状態と二種類の閉状態のあいだを遷移するらしいことがわかった。そしてその遷移挙動は膜電位に依存しないことが示唆された。また、平均開時間と遅い方の平均閉時間はともに 1 s ぐらいで、これまでのわれわれの報告を支持するものであった。速い方の平均閉時間を今回はじめて求めることができ、それはおよそ 0.2 s であった。なおこれら以外に、cell-attached recording では内向き電流にバーストがみられるが、これは outside-out 膜では消失することから、チャンネルの性質に由来するのではなく、細胞内の何らかの物質によるブロック現象であろうと推測された。これらのチャンネル特性は心筋の他のイオンチャンネルの特性と比較すると、とくに開閉の時定数が遅いという点で非常に特徴的である。いっぽう、上皮細胞など他の細胞が持っている Cl チャンネルに関しては、制御機構についての報告が多くあるものの、開閉挙動の詳しい解析はなされていない。心筋 Cl チャンネルの特性と他細胞 Cl チャンネルのそれとの比較は、今後の研究を待つことになろう。

心筋 Cl チャンネルに関して、燐酸化もしくは ATP の結合水解がなんらかの機構を介し

てチャンネルの開確率を段階的に増加させるという仮説が最近提唱されている (Gadsby ら、1993)。しかしわれわれの実験では、どのような条件においてもチャンネルの開確率が段階的に変化するようなことは観察されなかった。この問題については、さらに精密な研究が必要であろう。とくに inside-out 法による実験系の確立がなんとしても望まれる。

2. 今回の実験により、心筋 Cl⁻ チャンネルは β 受容体のみならず、プリン受容体によっても制御されていることが明らかとなった。ここで当然プリン受容体刺激後の細胞内情報伝達系が問題となる。われわれはこの点に関してまだ詳しい研究を行っていないが、心筋に対する P₁ もしくは P₂ 受容体刺激の効果に関する生化学的報告によれば、cyclic AMP 系の関与は否定的である。いっぽう、いろいろな細胞で、プリン受容体刺激はおそらくイノシトール三リン酸の形成を介して細胞内 Ca 濃度を上昇させ、それが膜コンダクタンスを変化させうることが知られている。しかし今回細胞内 Ca 濃度の変化を抑えるため、42 mM EGTA または 20 mM BAPTA をピペット液に含ませた条件下でも、ATP による Cl⁻ 電流活性化は観察された。したがって、われわれは Ca の関与も否定的であると考えている。細胞内情報伝達系に関してはさらに研究を進めることが必要である。

ATP がプリン受容体を介して心筋の Cl⁻ チャンネルを活性化することは、ATP が catecholamine とともに交感神経終末における共伝達物質であることからみて大変興味深いことである。また adenine nucleotide は心筋細胞自身からも放出されることが知られている。心筋 Cl⁻ チャンネルがさまざまなメカニズムによって活性化されうることには、どういう意味があるのだろうか。おそらく何らかの重要な生理学的意義を持っているに違いないが、病態生理学的な観点からの研究も含めて、さらなる研究の展開が望まれる。

【今後の課題】

単一 Cl⁻ チャンネルに関しては、その分子構造中の nucleotide binding domain の意義が不明となっている。そこに開確率が燐酸化などによってジャンプするか否かの命題が関係してくるわけであるが、チャンネルの活性化と活性維持における ATP の役割 (プリン受容体とは無関係の) をもっと詳しく解明する必要がある。そのためには inside-out 法の確立など新しい研究方法の開発が望まれる。

今回の実験ではプリン受容体刺激後の細胞内情報伝達系を明らかにできなかった。この問題は、心筋のみならず他の組織細胞系におけるプリン受容体反応でも明確になっていないのであって、今後ぜひ解明してゆきたいところである。また、心筋 Cl⁻ チャンネルは β 受容体のみによって活性化されるのではないことが明らかになったが、他にも未知の制御様式が存在するかも知れない。今後は多様な調節様式もありうるという柔軟な観点にたつて、チャンネル制御様式の全貌を明らかにしてゆきたい。

(別紙)

【研究の発表】

第 69 回日本生理学会大会

1992. 4.

心筋クロライドチャンネルの cyclic AMP による制御機構.

第 69 回日本生理学会大会

1992. 4.

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.

第 14 回国際心臓研究学会世界大会

1992. 5.

Properties and regulation of cardiac Cl^- channel.

文部省科学研究費補助金重点領域研究「心電活動」班会議

1992. 9.

心筋クロライドチャンネルの性質とその調節.

第 10 回国際心臓研究学会日本部会

1993. 6. (予定)

α -adrenergic modulation of the β -adrenoceptor-dependent Cl^- current in heart.

第 32 回世界生理科学会議

1992. 8. (予定)

Dual control of cyclic AMP-dependent cardiac chloride current by adrenergic system.

PROPERTIES AND REGULATION OF CARDIAC CHLORIDE CHANNEL

TSUGUHISA EHARA and HIROSHI MATSUURA

Department of Physiology, Saga Medical School

Summary

1. Properties of the cyclic AMP-regulated Cl^- channel were studied in guinea-pig ventricular myocytes with the patch clamp technique. Cell-attached patch recordings were performed, while the cell was dialyzed with a cyclic AMP-containing internal solution through a second patch pipette. In addition, Cl^- channel currents could also be recorded in the outside-out patched excised from the cyclic AMP-loaded cells. The channel seemed to have at least one open state and two closed states; the open-time histograms showed one exponential component with a time constant of about 1 s, while the closed-time histograms showed two exponential components with time constants of about 0.2 and 1 s. These time constants showed no clear voltage-dependence. The current-voltage relation of the Cl^- current observed in the outside-out patches showed outward rectification under the condition of symmetrical Cl^- gradients, suggesting that the channel itself or related structure has a property to rectify the current flow. The inward channel currents observed in the outside-out patches did not show any bursting activity, suggesting that the high-frequency closures during the burst seen in the cell-attached patches reflect fast-blocking phenomena caused by some intracellular substances.

2. In the whole cell clamp study performed in ventricular and atrial myocytes, external application of ATP (5 - 50 μM) was found to induce a Cl^- current, in addition to a rapidly desensitizing cation-selective current. A nonhydrolyzable ATP analogue, $\text{ATP}\gamma\text{S}$, also evoked these two currents, indicating involvement of purinoceptors rather than ecto-ATPase on the membrane. ADP, AMP, and adenosine were also effective in inducing the Cl^- current, showing no clear order of potency for the purinoceptor subtypes involved. The purinoceptor-activated Cl^- current, like the β -catecholamine-cyclic AMP-dependent cardiac Cl^- current, showed outward rectification and time-independence.