

9332 T細胞分化、細胞活性化と細胞膜電位

助成研究者:石田 康生(エイズ予防財団)

共同研究者:大野 博司(千葉大学)

T細胞活性化のメカニズムは近年細部にわたる解析が行なわれている。しかし細胞の基本構成成分である、細胞内外の無機イオンの透過性により細胞膜に発生する細胞膜電位の影響、生理的意義は殆ど知られていない。種々の電位依存性チャネルの存在がリンパ球で知られるようになって以来、T細胞機能と細胞膜電位の関連が研究されつつある。我々もこれまで、細胞内カルシウムイオン濃度の調節やリンパ球でどのように細胞膜電位が形成されているかを検討し、現在T細胞に存在するカルシウム依存性カリウムチャネルの機能およびそれによってもたらされる細胞膜過分極について解析を進めてきた。

細胞膜電位のT細胞活性化時に於ける変異とカルシウム応答への影響の検討した。T細胞の細胞膜電位はカルシウム応答時にT細胞に存在するカルシウム依存性カリウムチャネルの作用で活性化時に過分極へ極めて明確なスイッチングが行なわれる。カルシウム依存性カリウムチャネルの活性化がカルシウムイオンの電位勾配を上昇させ、カルシウム応答を容易にするとする説とは異なり、むしろT細胞では細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による電位の変化をカルシウム応答自体に影響しないよう調節している。この結果からT細胞では細胞膜電位の変化がカルシウム応答や細胞増殖以外の機能に関連していることも考えられた。

この問題解決のために内向き整流性カリウムチャネル遺伝子のトランスフェクタントを作製した。マウス内向き整流性カリウムチャネルは -50 mVより過分極側で開放しT細胞の過分極での生理を解析するのに都合がよくチャネル遺伝子IRK1をヒトT細胞腫株Jurkat細胞への導入した。作製したトランスフェクタントは 15 mM K培養液で維持した後、 1 mM K培養液に移すと1分以内に強く過分極したがクロライドチャネルにより静止膜電位にコンペイセイトされた。

リンパ系細胞では静止膜電位が非常に安定に維持される一方で通常状態で静止膜電位が過分極に傾くことが生理的に不都合である可能性が示唆された。T細胞活性化時にはカルシウム依存性カリウムチャネルによって過分極し静止膜電位は破られる。なぜそのような逆のホメオスタシスが働くのかこれからの課題である。

考察; 今回の実験結果からは、T細胞活性化に伴う細胞増殖、リンフォカインの産生、カルシウム応答には過分極は大きな影響を与えていないと結論され、なぜT細胞が過分極するかは疑問として残った。過分極状態そのものがT細胞の生理にどのような影響を与えるかを知ることが必要である。リンパ系細胞では過分極がカルシウム応答および細胞増殖を阻害するの報告されているがいずれも結論的ではない。IRK1トランスフェクタントはより生理的な状態で過分極の影響を検索しようと考えられ同様の実験を今後計画している。

9332 T細胞分化、細胞活性化と細胞膜電位

助成研究者:石田 康生(エイズ予防財団)

共同研究者:大野 博司(千葉大学)

目的 生体に於ける塩(無機イオン)は生体内環境のもっとも基本的な構成因子の一つである。細胞内外を等張に保ち、細胞膜非透過性成分の移送を担う。細胞膜では無機イオンの特異的膜透過性により細胞内陰性の膜電位が生じ、特に神経、筋細胞などの興奮性膜に於てはこの膜電位の変化が細胞活性を調節する。細胞内においても、カルシウムイオンはその増減がシグナル伝達のメッセンジャーとなっている。このように興奮性細胞での無機イオンの生理的役割は広く知られているが、非興奮性細胞でも例えば腎臓の尿管上皮細胞の様に水の移送に極めて効果的に無機イオンが利用される。

一方、T細胞活性化のメカニズムの解析は近年爆発的に進み細部にわたる解析が行なわれているにも拘わらず、細胞の基本構成成分である、細胞膜に発生する細胞膜電位の影響、生理的意義は殆ど知られていない。それでもこれまでに興奮性細胞に特異的に発現し機能するとされていた種々の電位依存性チャネルの存在がリンパ球で知られるようになって以来、T細胞機能と細胞膜電位の関連が研究され始めた¹⁾。我々もこれまで、細胞内カルシウムイオン濃度の調節やリンパ球でどのように細胞膜電位が形成されているかを検索してきた^{2,3)}。本研究課題ではこのような観点からT細胞活性を膜電位の変化を中心にその生理的意義の解析を試みた。その過程で明かとなった、T細胞に存在するカルシウム依存性カリウムチャネルの機能および細胞内カルシウムイオン濃度の上昇とそれによってもたらされる細胞膜過分極についての解析結果と、内向き整流性カリウムチャネルのT細胞腫への導入実験について述べる。

方法 1) 細胞; BALB/c マウス脾臓細胞または同細胞よりナイロンウールカラムあるいは抗体処理によりT細胞を精製し用いた。ヒトT細胞株 Jurkat 細胞は 10% FCS RPMI1640 で維持したものを利用した。

2) トランスフェクタントの作製; IRK1 DNA⁴⁾を pMKITNeo にサブクローニングし Jurkat 細胞にエレクトロポレーションによりトランスフェクトした。細胞は 6 mg/ml G418/ 10 mM KCl を添加した 10% FCS RPMI1640 で選択しその後、低カリウム溶液内での過分極を指標にしてトランスフェクタントを確立した。

3) 細胞内カルシウムイオン濃度および細胞膜電位の測定; 「カルシウムイオン濃度」は細胞を指標色素 indo-1 でロードし^{2,3)}、「細胞膜電位」

は指標色素 di-BA-C4 (3)、または di-BA-C4 (5) で染色して Flow cytometry により測定した。

4) T 細胞の刺激; 抗 CD3 抗体により細胞をクロスリンクし刺激した。細胞増殖反応に際しては抗 CD3 抗体をカルチャープレートに固着化した。刺激はエアヒーターを用いすべて 37 C でおこなった。

5) 細胞培養液および緩衝液; inorganic salt free 2x Iscove's MEM/F12 に無機塩を加え調整し pH 緩衝には 10 mM HEPES を用いた。この際、CaCl₂; 10 μM · 2 mM, KCl; 0 · 75 mM の間で調整し種々の組み合わせを作った。また増殖反応の測定には 10% FCS をさらに加えた。

結果 I] 細胞膜電位の T 細胞活性化時に於ける変異とカルシウム応答への影響。

1) 細胞膜電位とカルシウム応答の関係。従来よりの報告どおりカルシウム応答時に T 細胞に存在するカルシウム依存性カリウムチャネルの作用で強く過分極する^{5,6)}。いっぽう実験によってはカルシウム応答の極く初期に弱い脱分極を検知しうる。この現象は緩衝液からカルシウムイオンを除くと極めて著明になり、最終的には電位 0 V 近くまで脱分極する。

2) T 細胞のカルシウム依存性カリウムチャネル活性の threshold value は細胞内カルシウムイオン濃度 300 nMにある (図 1)。細胞外液のカルシウムイオン濃度を 2 mM から 10 μM の間で変化させカルシウム応答と細胞膜電位の変化を測定したところ、100 μM の細胞外カルシウムイオン濃度では細胞は刺激後初め弱く脱分極し細胞内カルシウムイオン濃度が 300 nM を越えると突然過分極を開始する。一部の細胞はこの threshold に至らず強く脱分極し続ける。この結果 flow cytometry での測定上、細胞内カルシウムイオン濃度/細胞膜電位の関連から a) カルシウムイオン濃度が 300 nM 以上で過分極する群と b) カルシウムイオン濃度が 300 nM 以下で脱分極する群に二分される。これらの T 細胞はいまのところ特定の細胞膜マーカーは同定されず、また両者間にゆっくりとした移行が見られることから、T 細胞サブセットによる表現型の違いというよりカルシウム応答の個々の細胞間のバラツキに基づいていると考えられる。

3) T 細胞カルシウム応答は正常細胞外カルシウムイオン濃度では細胞膜電位の影響を受けない。T 細胞カルシウム応答の大半は細胞外カルシウムイオンの流入によって引き起こされる。従って、その流入がカルシウムイオンの濃度勾配と細胞内外の荷電によってのみ支配されるなら、カルシウム依存性カリウムチャネル活性化はカルシウム応答を亢進させるはずである。しかし、カルシウム依存性カリウムチャネル活性を Charybdotoxin で抑制するか、高カリウム溶液を用いることにより細胞膜電位を -90 から -10 mV の範囲で調節してもカルシウム応答は変わらなかった。

4) T 細胞ではカルシウムイオンは強く緩衝することで細胞内カルシウムイオン濃度を一定に保っている。細胞外カルシウムイオン濃度を 2 mM か

ら 10 mM で変化させ同時に細胞膜電位を調節すると、細胞膜電位が約 0 mV では生理的細胞外カルシウムイオン濃度以下になればカルシウム応答は維持されず、一方、生理的カリウムイオン濃度の細胞外液ではカルシウムイオン濃度が 100 mM であっても正常のカルシウム応答が観測された。これらは T 細胞のカルシウム応答が 10 倍のカルシウム濃度勾配の変化に対しても緩衝しえる事を意味し、この濃度勾配の変化による影響は T 細胞膜電位の生理的変動による影響にほぼ一致する。

5) 正常細胞外カルシウム濃度では T 細胞カルシウム応答の経時変化は細胞膜の過分極、脱分極にかかわらず一定である。細胞外カリウム濃度を変え細胞膜電位を調節しそれぞれの電位でのカルシウム応答を比較した所、いずれの状態であっても反応は同一であった。従って、カルシウム依存性カリウムチャネルの活性化がカルシウムイオンの電位勾配を上昇させ結果として、カルシウム応答を容易にするとする説^{7,8,9)}とは異なり、T 細胞では細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による電位の変化をカルシウム応答自体が影響されないように調節されている。

6) 正常細胞外カルシウムイオン濃度が保たれば細胞膜電位を理論上 -90 から 0 mV に変化させても T 細胞増殖反応は影響を受けない(図 2)。カルシウム応答で得られた結果がその後の T 細胞増殖反応にどのように関連するかを検索した。細胞外カリウムイオンおよびカルシウムイオン濃度を同時に変えた種々の培養液を用い細胞増殖と IL2 産生を測定した。増殖反応はカルシウム応答とほぼ完全に一致し、T 細胞活性時の細胞膜電位の変化は増殖反応、リンフォカインの産生に明らかな影響を及ぼさなかった。

これらの結果から細胞膜電位の変化がカルシウム応答、細胞増殖以外の機能に関連していると考えられ、カルシウム依存性カリウムチャネルを利用した細胞膜電位のマニピュレーションだけでは T 細胞の過分極の意義を解釈し難いと考えられ、以下の実験を試みた。

11] カリウムイオンチャネル導入による細胞膜電位のマニピュレーション。

これまで細胞膜電位のマニピュレーションはカルシウム依存性カリウムチャネルを利用して行なってきたが T 細胞活性化との関連を知るうえでは好都合な系であった。しかしカルシウム応答と切り離して細胞膜電位の機能を知るうえで問題があり、これまでの実験経緯から膜電位単独でのマニピュレーションが必要になってきた。この目的の為にカリウムイオンフォアのヴァリノマイシン^{10,11)}が以前より利用されているがリンパ球に対しては細胞毒性が強く不適當であった。電位非依存性カリウムチャネル細胞への導入が最も生理状態に近いと考えられ、今回、内向き整流性カリウムチャネル遺伝子のトランスフェクタントを作製した。

1) マウス内向き整流性カリウムチャネルのヒト T 細胞腫株 Jurkat 細胞への導入。都立神経研の久保らにより遺伝子が単離された内向き整流性カリウムチャネル⁴⁾は -50 mV より過分極側で開放し正常細胞外液のイオン濃度で細胞の静止膜電位をカリウムの平衡電位に近づける為 T 細胞の過分極での生理を解析するのに都合がよいと考えられた。またマウス、ヒトリンパ球ではこのチャネルは同定されていなく新しく導入が可能である。そこでこの遺伝子をヒト T 細胞株 Jurkat 細胞へ導入し発現させることを試みた。チャネル遺伝子 IRK1 は University of California の Dr. L. Jan より供与を受けた。発現ベクター pMKIT.Neo を用い細胞へ導入し、細胞は 15 mM カリウムイオンを含む培養液で維持し G418 による選択の後、チャネル機能発現は低カリウムイオン溶液内で細胞が過分極することを指標にチェックした。

2) IRK1 導入細胞は低カリウム培養液内で過分極を示す(図 3)。フローサイトメトリーを用い G418 抵抗性クローンをスクリーニングし 4 クローンを分離した。これらの細胞は 15 mM K 培養液で維持した後、1 mM K 培養液に移すと 1 分以内に強く過分極し 10 mM KCl を添加することで非導入細胞の静止膜電位のレベルに戻った。

3) IRK1 導入細胞の低カリウム培養液内で過分極は一過性である。細胞を 37 C に維持し低カリウム培養液に移行させると、過分極は極く短時間しか維持されず不安定であり、すぐに正常の静止膜電位に戻る。これらの処理を室温で行なうと過分極は 15 分以上維持されるがやはり不安定かつ一過性である。導入したカリウムチャネルの非活性化ないし、他の機構によるコンペンセーションが考えられた。

4) クロライドチャンネルブロッカーにより IRK1 導入細胞はより長時間の過分極を維持できる。静止膜電位は複数のチャネル機能等によって形成される。リンパ系細胞ではナトリウムチャネルは存在せず、過分極にたいし脱分極方向に作用するのはクロライドチャンネルである。そこでトランスフェクタントを同チャンネルブロッカーの DIDS で処理し低カリウム溶液に移すと、細胞はより強く安定した過分極を示した。

これらの事実からリンパ系細胞では静止膜電位が非常に安定に維持される一方で通常状態で静止膜電位が過分極に傾くことが生理的に不都合である可能性が示唆された。しかし T 細胞活性時にはカルシウム依存性カリウムチャネルによって過分極し通常静止膜電位は破られる。なぜそのような逆のホメオスターシスが働くのかが今後の検討課題である。今回作製した IRK1 トランスフェクタントは有用な材料であると考えられる。

考察； T 細胞活性時の細胞膜過分極の生理的意義は未だ明確ではない。今回の実験結果からは、T 細胞活性に伴う細胞増殖、リンフォカインの産生、カル

シウム応答には過分極は大きな影響を与えていないと結論できる。それではなぜ過分極するのかという疑問が残り、それに対する幾つかの検証法が考えられる。

一つには、過分極状態が T 細胞の生理にどのような影響を与えるかを知ることである。その一環として行なったのが過分極の静止膜電位を誘導しうる、内向き整流性カリウムチャネルの導入である。導入の結果明かになったのはトランスフェクタントでは強制的過分極に対しても十分にコンペンセーションが作用し正常の静止膜電位が維持されるというものであった。過去の報告では細胞の過分極は線維芽細胞では細胞分裂を強く抑制し¹²⁾、リンパ系細胞ではカルシウム応答および細胞増殖を阻害するとされている^{13, 14)}。いずれも古く結論的ではないが、示唆的である。IRK 1 トランスフェクタントはより生理的な状態で過分極の影響を検索しうると考えられ同様の実験を今後計画している。

第二にはカルシウム依存性カリウムチャネルそのものの解析から、同チャネルのもたらす細胞の過分極の意味を解釈することである。このためにチャネル遺伝子のクローニングを進めており、既に部分的なクローニングに成功している。このチャネルはマウスでは最近神経筋組織より取られており¹⁵⁾、オルタナティブスプライスウィングによる特異な多様性が知られている。リンパ系では中枢神経に比べ明かに多様性が少なく、かなり異なった、エクソンの使用が示唆されている。解析はまだ極めて不十分であるが、最終的にはリンパ球に特異発現するチャネルのノックアウトによる解析が可能かつ必要と考えている。

参考文献

- 1) Lewis, R. S., and M. D. Cahalan. The plasticity of ion channels: parallels between the nervous and immune systems. *TINS*. 11;214-218 (1988)
- 2) Ishida, Y. and Chused, T. M. Heterogeneity of Calcium-Sensitive Potassium Channel and Sensitivity of the Calcium ATPase Pump to Membrane Potential. *J. Exp. Med.* 168; 839-852 (1988)
- 3) Ishida, Y. and Chused, T. M. Lack of Voltage Sensitive Potassium Channels and Generation of Membrane Potential by Sodium Potassium ATPase. *J. Immunol.* 151;610-620 (1993)
- 4) Kubo, Y., T. J. Baldwin, Y. N. Jan, and L. Y. Jan. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*. 362;127-133 (1993)
- 5) Tsien, R. Y., Pozzan, T., and Rink, T. J. T-cell mitogens cause early changes in cytoplasmic free Ca^{2+} and membrane potential in

- lymphocytes. *Nature*. 259:68-71 (1982)
- 6) Wilson, H.A., and T.M. Chused. Lymphocyte membrane potential and Ca^{2+} -sensitive potassium channels described by oxonol dye fluorescence measurements. *J. Cell. Physiol.* 125:72-81 (1987)
 - 7) Grissmer, S., Lewis, R.S., and Cahalan, M.D. Ca^{2+} -activated K^+ channels in human leukemin T cell. *J. Gen. Physiol.* 99:63-84 (1992)
 - 8) Hess, S., Oortgiesen, M. and Cahalan, M.D. Calcium oscillations in human T and natural killer cells depend upon membrane potential and calcium influx. *J. Immunol.* 150:2620-2633 (1993)
 - 9) Lin, C.S., Boltz, R.C., Blake, J.T., Nguyen, M., Talento, A., Fischer, P.A., Springer, M.S., Sigal, N.H., Slaughter, R.S., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., and Koo, G.C. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 177:637-645 (1993)
 - 10) Kiefer, H., A.J. Blume, and H.R. Kaback. Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:2200-2204 (1980)
 - 11) Gelfand, E.W., R.K. Cheung, and S. Grimstein. Role of membrane potential in the regulation of lectin-induced calcium uptake. *J. Cell. Physiol.* 121:533-539 (1984)
 - 12) C.D. Cone, Jr. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *J. theor. Biol.* 30:151-181 (1971)
 - 13) Daniel, R.P. and S.K. Holian. A potassium ionophore (valinomycin) inhibits lymphocyte proliferation by its effects on the cell membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73:3599-3602 (1976)
 - 14) Ottgen, H.C., C. Terhorst, L.C. Cantley, and P.M. Rosoff. Stimulation of the T3-T cell receptor complex induces a membrane-potential-sensitive calcium influx. *Cell*. 40:583-590 (1985)
 - 15) Bulter, A., S. Tsunoda, D.P. McCobb, A. Wei, and L. Salkoff. *mSlo*, a complex mouse gene encoding "maxi" calcium-activated potassium channels. *Science*. 261:221-224 (1993)

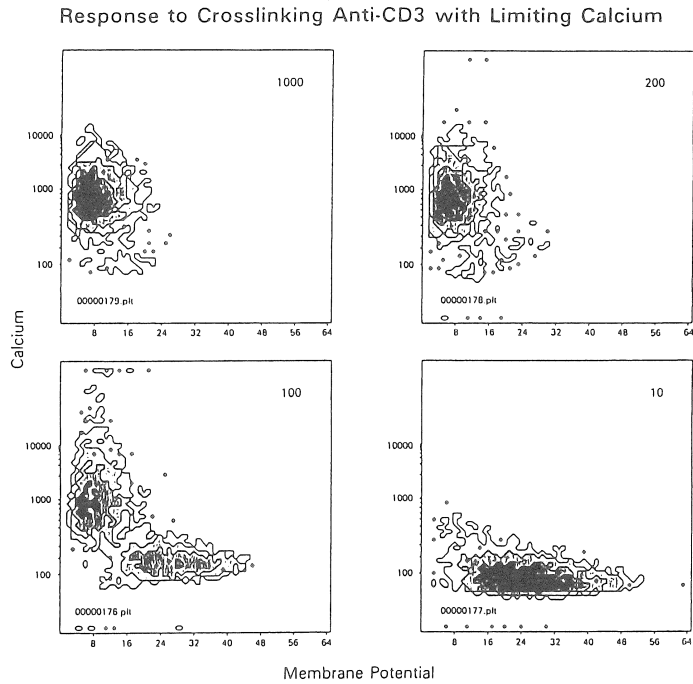


図 1 ; T 細胞活性化時のカルシウム応答と細胞膜電位。

X 軸は oxonol fluorescence を Y 軸は細胞内カルシウムイオン濃度を示す。oxonol fluorescence は膜電位を表示し、0 方向は陰性電位を逆は陽性電位を示す。膜電位のキャリブレーションはスタンダードを用い決定した²⁾。各図の右上の数字は細胞外溶液のカルシウムイオン濃度 (mM) を示す。カルシウムイオン濃度が 1000・200 mM では T 細胞のほぼ全体が強いカルシウム応答と過分極を示し、10 mM ではほぼ全てが脱分極する。100 mM では半数が過分極している。脱分閾から過分極への細胞内カルシウムイオン濃度の閾値は約 300 nM である。過分極状態にある活性化 T 細胞のカルシウムイオン濃度は細胞外濃度に拘わらず一定値を示す。

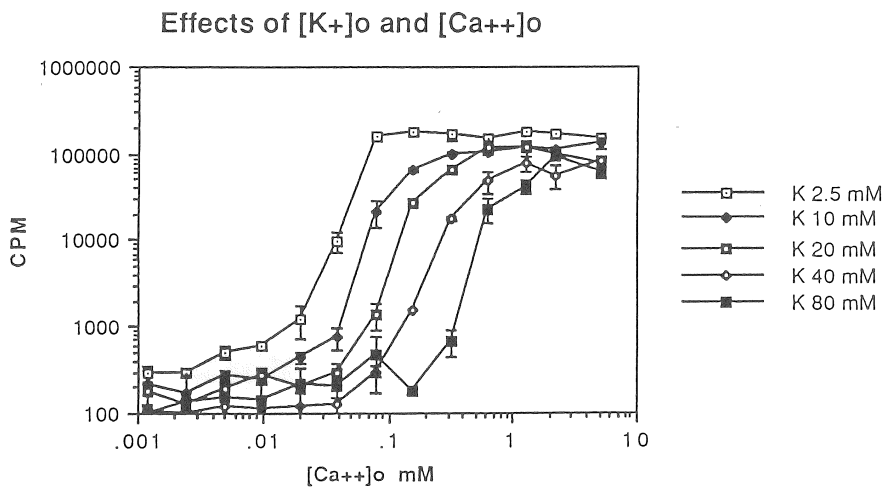


図 2 ; T 細胞増殖反応と細胞外カルシウムイオンおよびカリウムイオン濃度の関連。

図中に示される細胞外カルシウムイオンおよびカリウムイオンを含む培養液で抗 CD3 抗体と共に 2 日間培養し細胞増殖を ³H-thymidine uptake により測定した。細胞外カリウムイオン濃度の変化により EK にはほぼ一致する膜電位が得られる。したがって、脱分極状態に比べ過分極ではより少ない細胞外カルシウムイオン濃度で増殖反応が認められるが最大増殖能は一定を示す。

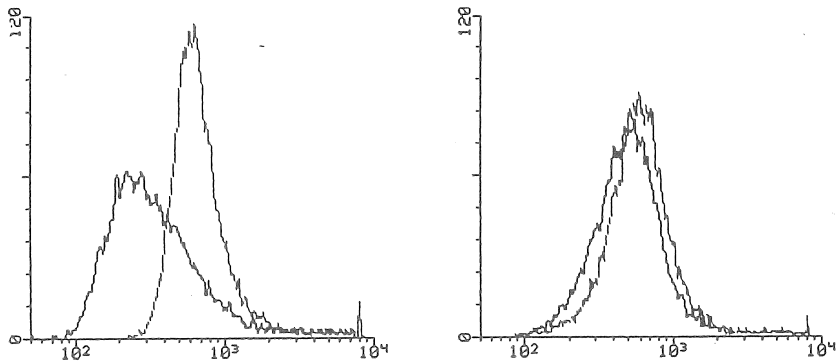


図 3 ; IRK 1 トランスフェクタントと細胞膜電位。

10 mM KCl を添加した培養液で維持したトランスフェクタントを最終濃度 1.5 mM の K^+ を含む溶液に移し膜電位の変化を測定した。左図では低カリウム溶液内および 11.5 mM KCl を含む溶液 (コントロール) での膜電位 (oxonol fluorescence) を示す。低カリウム溶液ではコントロールに比べ蛍光強度は強く左方に変位し細胞は過分極を示す。右図では左図と同じ条件の細胞を 37 C でさらに 5 分間培養した場合を示す。コントロールと低カリウム溶液間に差は無く過分極は解消されている。

T-cell development, activation and membrane potential

Yasuo Ishida (Japanese Foundation of AIDS Prevention)

Hiroshi Ohno (Molecular Genetics, Center for Biomedical Science, Chiba University)

Summery

Plasma membrane potential (Ψ) generated by inorganic ion permeation through the membrane is one of the most important cellular microenvironment. Several concentrated works during past two decades, in particular of excitable cells, have clarified the mechanisms of membrane physiology. We, however, have still limited knowledge in T cell physiology, especially roles of Ψ . We have focused on the points and studied the regulation of intracellular free calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$), how lymphocytes generate and maintain their Ψ , and analyzed how hyperpolarized Ψ influences T-cell activation.

Our findings are 1) T-cells possess calcium-dependent potassium channel, 2) the channel can be active at above 300 nM $[Ca^{2+}]_i$ and hyperpolarize the cell, 3) magnitude of calcium response, however, was constant throughout physiologic Ψ , and in even over 10 fold lower $[Ca^{2+}]_i$ level, 4) T-cell proliferation and lymphokine secretion were identical to calcium response, and 5) T-cell did not sensitively respond to TCR stimulation in hyperpolarized Ψ though the condition must enhance electrochemical gradient that drives calcium ion influx. The results suggested that activation-induced hyperpolarization might play more important role rather than effective driving force of extracellular calcium ion though calcium elevation controls the condition.

We established Jurkat cell transfectants introduced by inward rectifier potassium channel gene (IRK1) to clarify physiologic role of hyperpolarized Ψ without $[Ca^{2+}]_i$ elevation. Transfectants initially showed strong hyperpolarization in low potassium medium. The condition, however, continued less than 5 minutes at 37 C. Chloride channels compensated to normal resting Ψ . Since expressed IRK1 channels could excessively permeate K^+ to force Ψ more negative, result suggests the presence of strong buffering reaction to maintain resting Ψ . We are planning to analyze the physiologic meanings of opposite Ψ regulation in the resting and activated T cells.