

9441 心筋細胞クロライドチャンネルの調節機構

助成研究者： 穎原 嗣尚 (佐賀医科大学 医学部)

共同研究者： 彌富 郁夫 (佐賀医科大学 医学部)

平原 健司 (佐賀医科大学 医学部)

最近、心筋細胞膜にはカテコラミン β 受容体によって活性化される cyclic AMP 依存性のクロライド (Cl) 電流が存在することが明らかにされ、この電流の基となっている Cl チャンネルが同定された。その β 作用による活性化機構には、cyclic AMP 依存性の protein kinase (PKA) によるチャンネルのリン酸化が関与していることもわかってきた。いっぽう、catecholamine の α 作用もまた心筋のさまざまな電流系 (例えば遅延整流性 K 電流) に影響を与えることが知られている。しかしながら Cl 電流と α 作用との関係については今まで研究されていない。そこで今回、 β 作用によって活性化された Cl 電流に対する α 作用について実験を行った。

酵素処理によって得られたモルモット心室筋細胞を標本とし、パッチクランプ法により whole cell clamp を行った。細胞内液および外液を Cl 電流以外の電流が発生しにくい組成のものとし、ランプパルスを印加することにより Cl コンダクタンスを測定した。一部の実験では、outside-out patch 法による単一チャンネル記録を試みた。

Noradrenaline によって活性化される Cl コンダクタンスの大きさは、 α_1 ブロッカーである prazosin の存在下で有意に上昇した。 α_1 アゴニストである phenylephrine (PHE) または methoxamine は β アゴニストである isoprenaline (ISO) によって活性化された Cl コンダクタンスを減少させた。Cl コンダクタンス活性化における ISO の用量作用曲線は、30 μ M の PHE 添加により右方にシフトした。以上の結果は、 α_1 受容体刺激は β 受容体依存性の Cl コンダクタンス活性化を抑制することを示す。同じような α_1 作用と β 作用との干渉は、outside-out patch 法により単一チャンネルレベルでも観察できた。

しかし PHE は、forskolin によって活性化された Cl コンダクタンスに対しては無効であった。また、GTP γ S を細胞内に負荷した細胞において β 刺激により遷延性に活性化された Cl コンダクタンスも PHE の影響を受けなかった。これらの所見は、 α_1 作用は adenylate cyclase が活性化されるより以前のステップで β 作用を抑制していることを示唆するものである。これは、acetylcholine が adenylate cyclase を競合的に抑制して Cl 電流を抑えることと対照的である。

また、ISO 誘発 Cl 電流に対する PHE の抑制効果は、細胞に 20 mM という高濃度の BAPTA を負荷した条件下でも存続した。このことは、観察された α_1 作用の発現過程に Ca イオンは関与していないことを示唆するものである。

9441 心筋細胞クロライドチャンネルの調節機構

助成研究者： 顔原 嗣尚 (佐賀医科大学 医学部)

共同研究者： 彌富 郁夫 (佐賀医科大学 医学部)

平原 健司 (佐賀医科大学 医学部)

【研究目的】

心筋において、catecholamine-cyclic AMP 系は膜興奮に対して重要な影響を持っている。最近、心筋細胞膜にはカテコラミン β 受容体によって活性化される cyclic AMP 依存性のクロライド (Cl) 電流が存在することが明らかにされ、この電流の基となっている Cl チャンネルが同定された。その β 作用による活性化機構も詳細に研究され、cyclic AMP 依存性の protein kinase (PKA) によるチャンネルの燐酸化が重要な役割を果たしていることもわかってきた。しかしながら、 β 作用のみが心筋 Cl 電流を調節しているのではない。histamine も PKA を介して Cl 電流を活性化すること、acetylcholine はムスカリン受容体を介して β 作用に拮抗し、その作用はadenylate cyclaseの競合的抑制によることなども知られている。

一方、catecholamine の α 作用もまた心筋のさまざまな電流系 (例えば遅延整流性 K 電流) に影響を与えることが明らかになっている。しかしながら Cl 電流と α 作用との関係については今まで研究がなされていない。最近我々は、 β 作用によって活性化された Cl 電流が α 作用によって抑制されることを見出した。この現象は、生理的交感神経伝達物質であるノルアドレナリンが両作用を持つことから大変興味深いことと思われる。そこで本研究では、次のようなことを目的として実験を行った。

1. Cl 電流活性化における catecholamine の α 作用と β 作用の干渉の実態を詳細に明らかにする。
2. α 作用による Cl 電流修飾においてどのような細胞内情報伝達系が関与しているのかについて研究を進める。
3. 単一チャンネルレベルにおいて α 作用は Cl チャンネルにどのような影響を与えているかを明らかにする。

【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

下に patch clamp 法により whole cell clamp を行った。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。その電流電圧関係の測定には、三角波の過分極部を用いた。一部の実験では、outside-out patch 法による単一チャンネル記録を行った。得られたデータは、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再生解析した。

正常タイロド液の組成は (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 における Cl 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, $MgCl_2$ 2.0, 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。細胞内液 (電極液) の組成は次の通りである (mM)。CsOH 90, aspartate 90, CsCl 30, $MgCl_2$ 2.0, TEA-Cl 20, EGTA 5, glucose 10, HEPES-CsOH 5 (pH 7.2)。Outside-out patch の実験においても電極液にはこれと同じものを用いた。すべて実験は 35 ± 0.5 °C で行った。

【研究結果】

上記の細胞内および外液を用いた条件では、 β 作用によって活性化される膜電流は Cl 電流であることがわかっている。今回はまず α と β の両作用をもつ noradrenaline (NOR) の Cl 電流誘発効果が α 遮断薬によって影響されるかどうかを検討した。Fig. 1 にその結果の 1 例を示す。NOR によって活性化される Cl 電流の大きさは、 α_1 遮断薬である prazosin (PRZ, 5 μ M) 添加によって増大している。同様な実験を、3 種 (0.1, 1 および 10 μ M) の濃度の NOR を用いて繰り返し行ったところ、いずれの濃度においても PRZ は NOR 依存性の Cl コンダクタンスを有意に増大させた。

上記の結果は、 α_1 作用は β 作用に影響を与えることを示唆している。そこで β 作用のみを持つ isoprenaline (ISO) の Cl 電流誘発効果に対して α_1 作動薬である phenylephrine (PIIE) がいかに作用するかを直接検討した。Fig. 2 にその結果の 1 例を示す。0.2 μ M の ISO によって誘発された Cl コンダクタンスは PIIE (40 μ M) の作用によって明らかに減少している。Fig. 3 は多数例から得られたデータを用いた用量作用曲線として示したものである。Cl コンダクタンス活性化における ISO の用量作用曲線において、 K_{half} はコントロールでは 28 nM であったが、30 μ M の PIIE 存在下で 86 nM に増加した。同様な α_1 作用と β 作用の干渉は他の α_1 作動薬である methoxamine (~ 100 μ M) を用いても観察された。一方、これらの α_1 作動薬は単独では細胞のコンダクタンスになんらの影響を及ぼさなかった。そこで我々は、 α_1 受容体刺激は β 受容体依存性の Cl コンダクタンス活性化を抑制すると結論した。

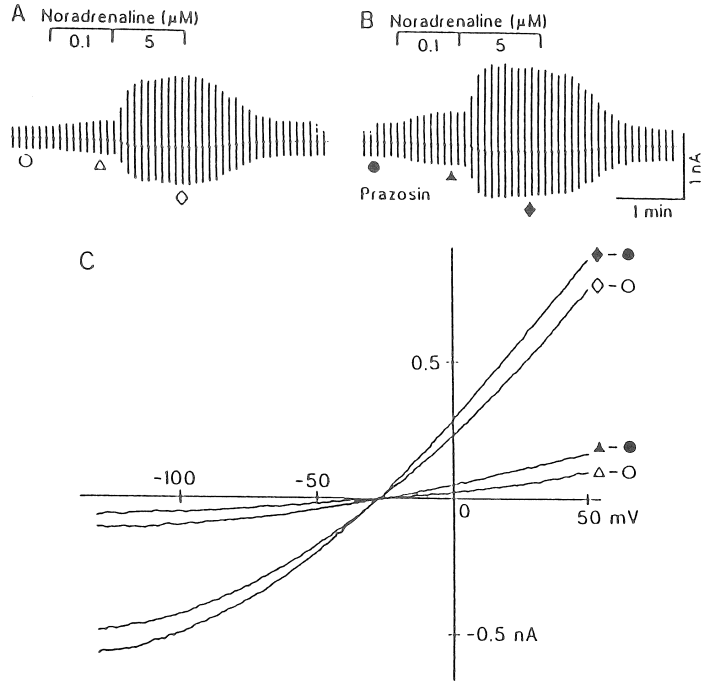


Fig. 1. Enhancement of noradrenaline-activated Cl^- current by an α_1 -blocker, prazosin

A and B, chart records of membrane current in response to ramp pulses obtained in the absence (A) and presence (B) of prazosin ($5 \mu\text{M}$). Noradrenaline (0.1 and $5 \mu\text{M}$) was applied for the period indicated by bars; C, I - V relations of noradrenaline-induced current obtained in the absence (Δ - \circ and \diamond - \circ) and presence (\blacktriangle - \bullet and \blacklozenge - \bullet) of prazosin. Noradrenaline-induced currents were obtained by subtracting control I - V relation from the I - V relation with 0.1 and $5 \mu\text{M}$ noradrenaline, respectively.

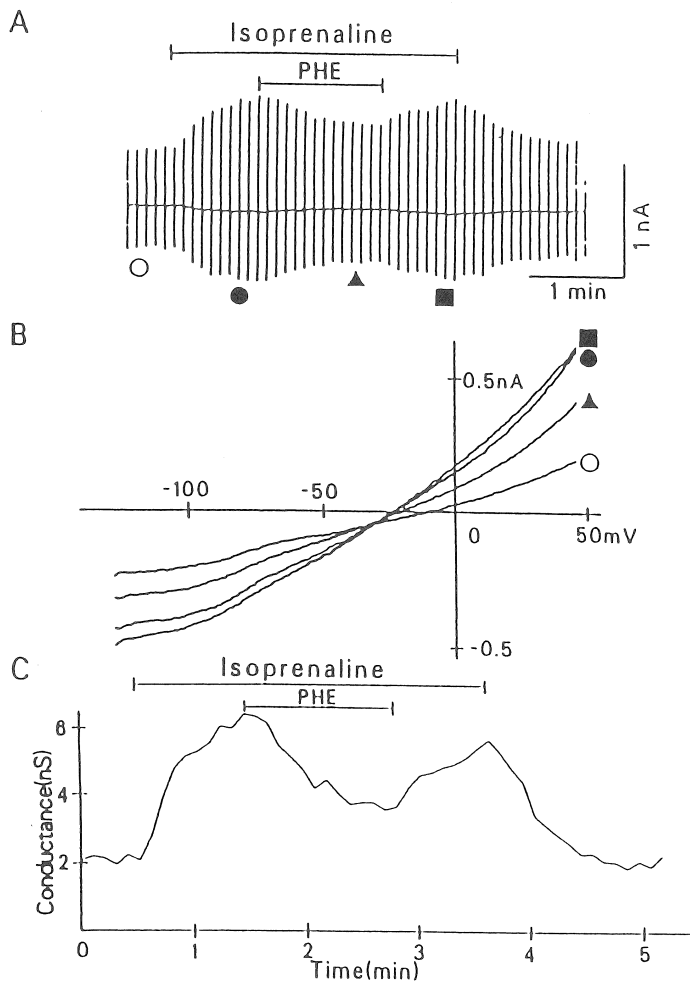


Fig. 2. Suppression of isoprenaline-activated Cl^- current by phenylephrine

A, chart record of membrane current in response to ramp pulses. Isoprenaline (0.2 μM) and phenylephrine (PHE, 40 μM) were applied for the period indicated by bars. Current traces indicated by the symbols are the sources for *I-V* relations shown in B. *I-V* relations obtained in control solution (○) and in the presence of isoprenaline without (● and ■) and with (▲) phenylephrine. C, time course of membrane conductance obtained in the experiment shown in A.

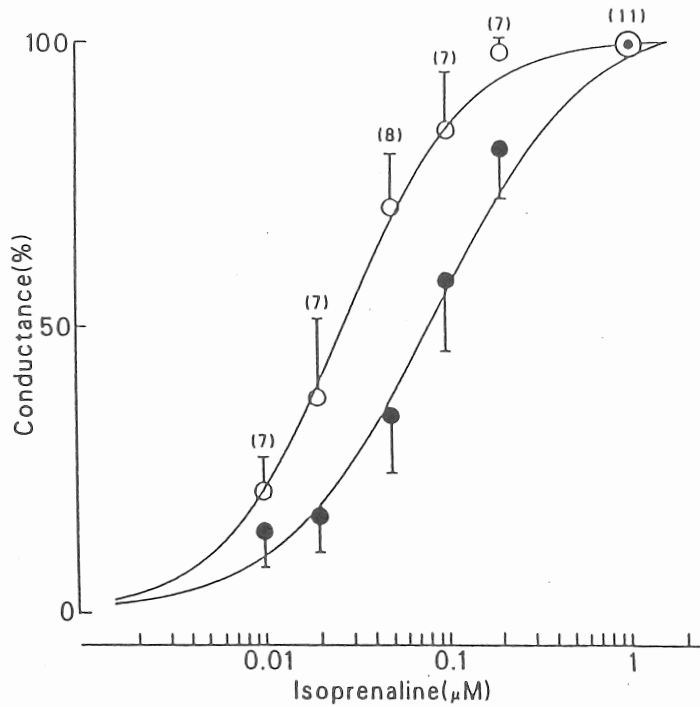


Fig. 3. Dose-response relations for the Cl⁻ conductance and isoprenaline as influenced by phenylephrine

Cl⁻ conductance was measured in the absence and presence of phenylephrine (30 μM) at different isoprenaline concentrations. In every experiment, Cl⁻ conductance induced by 1 μM isoprenaline was at least once determined in the absence of phenylephrine, and conductance data for lower isoprenaline concentrations, with (●) or without (○) phenylephrine, were expressed as relative to this value. In the graph, each data point represents mean + or - S.D. S.D. for the data at 1 μM isoprenaline with phenylephrine was within the symbol. Numbers in parentheses are the number of paired data at each isoprenaline concentration. The smooth curves were drawn by the least-square fits of the Hill equation, normalized conductance = $1/(1+(K_{1/2}/[\text{drug}])^n)$, where $K_{1/2}$ is the half-maximally activating drug concentration, and n is the Hill coefficient. Control: $K_{1/2} = 28 \text{ nM}$, $n = 1.3$. With phenylephrine: $K_{1/2} = 86 \text{ nM}$, $n = 1.1$.

Outside-out patch 膜から単一 Cl チャンネル電流を記録できることがわかっている。そこでこのシステムを用いて、単一チャンネルレベルで α_1 作用と β 作用の干渉を検討することを試みた。すなわち、通常の細胞内液を含む patch 電極を用いて outside-out patch 膜を形成し、膜の外側に adrenaline (ADR) と PIII を作用させるのである。しかし、電氣的に安定した outside-out patch 膜を得ることははなはだ困難であった。しかも安定な outside-out patch 膜が必ずしも ADR に反応して Cl チャンネル活動を示すとは限らなかった。結局、我々は7例の outside-out patch 膜において ADR によって誘発された Cl チャンネル活動を記録でき、その内の2例において Cl チャンネル活動に対する α_1 作用と β 作用の相互干渉を観察できた。Fig. 4 に示すのはその1例から得られた結果である。PIII (50 μ M) は ADR (5 μ M) によって誘発された Cl チャンネル活動を明らかに抑制している。その抑制は、主としてチャンネル開確率の著しい減少として現れているようであるが (Fig. 4Bb)、しかしこの例では PIII 存在中に開確率の変動もみられた (Fig. 4Bc)。多くの outside-out patch 膜が agonist と antagonist に対して反応しなかったことの原因は不明である。しかしながら上記の実験結果は、 α_1 作用による whole cell Cl 電流の抑制は、活性化された Cl チャンネル群の少なくとも一部分が脱活性化を受けたためであることを示唆すると思われる。

Forskolin は β 受容体とは無関係に adenylate cyclase を直接活性化する薬物である。もし α_1 作用が、ムスカリン作用と同様に、adenylate cyclase を競合的に抑制することによって β 作用を抑制するのであれば、 α_1 受容体刺激は forskolin により活性化された Cl 電流を抑制することが期待される。そこで forskolin 反応が PIII によって影響されるか否かを検討した。Fig. 5 に示す実験は、まず 2.5 μ M の forskolin により Cl 電流を誘発しておき、そのあと 2 μ M の acetylcholine と 40 μ M の PIII の効果を見たものである。Acetylcholine は期待どおり forskolin 誘発 Cl 電流をみごとに抑制したが、PIII は何らの効果も示さなかった。同様な実験を高低種々の濃度 (0.5~5 μ M) の forskolin を用いて繰り返し行ったが、結果は同じであった。これらの所見は α_1 作用は adenylate cyclase を直接抑制するのではないということを示唆する。すなわち、 α_1 受容体刺激は、adenylate cyclase が活性化されるより以前の段階で β アドレナリン性の情報伝達路を抑制していると考えられる。

β 受容体と無関係に Cl 電流を活性化する他の方法は、水解しにくい GTP 誘導体である GTP γ S を細胞に負荷しておき、 β 受容体を刺激することである。そのあと β 受容体刺激薬を取り除いても adenylate cyclase は刺激され続けるので、Cl 電流は遷延性に活性化されたままの状態となる。そこで、この遷延性に活性化された Cl 電流に対する PIII の効果を検討してみたが、PIII の効果は観察されなかった。この所見もまた、 α_1 作用は adenylate cyclase を直接抑制するのではないことを示唆している。

いくつかの心筋標本において、 α_1 受容体刺激は細胞内の Ca 濃度を上昇させるとの報告

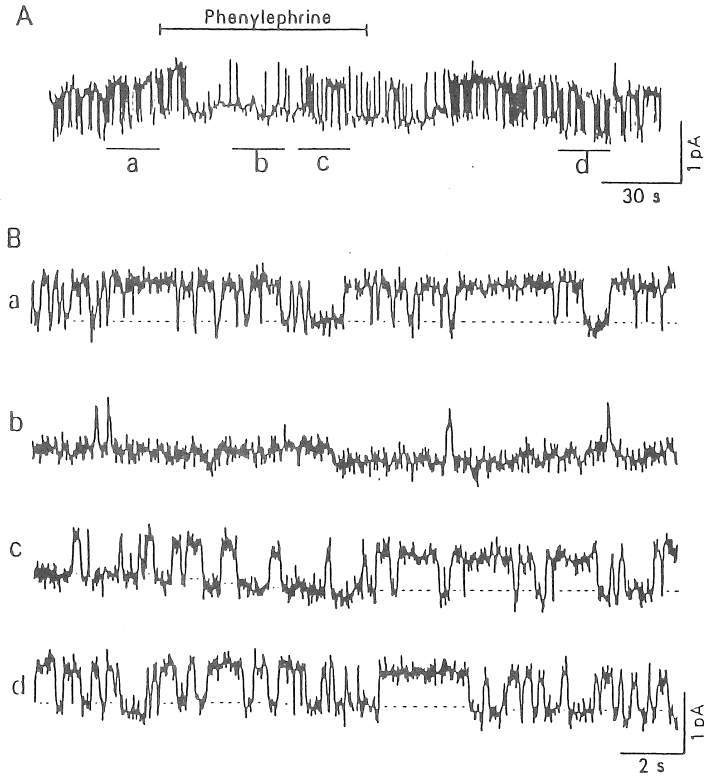


Fig. 4. Out-side out patch recording showing the effect of phenylephrine on the single Cl^- channel currents

The activity of Cl^- channel was induced in an outside-out patch by exposing the patch membrane to $5 \mu\text{M}$ adrenaline, and $50 \mu\text{M}$ phenylephrine was further added to the bath (bar above the current trace in A) in the continuous presence of adrenaline. B shows expanded records of the parts of A indicated by bars (a, b, c, and d). The patch membrane was held at $+40 \text{ mV}$ throughout. Dotted lines indicate closed levels.

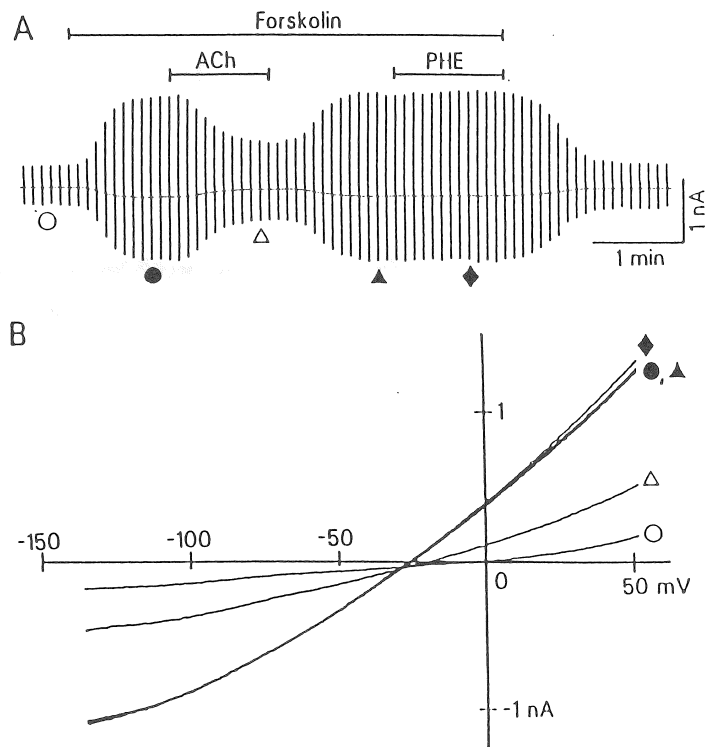


Fig. 5. Effects of acetylcholine and phenylephrine on forskolin-induced Cl^- conductance

The cell was first exposed to $2.5 \mu\text{M}$ forskolin and then to $2 \mu\text{M}$ acetylcholine (ACh) and $50 \mu\text{M}$ phenylephrine (PHE), as shown in A which shows chart record of membrane currents. B shows I - V relations obtained at the times indicated by the corresponding symbols in A. Propranolol ($1 \mu\text{M}$) was present throughout.

がある。今回の実験では細胞内液は 5 mM の F/GTA を含んでいるので細胞内 Ca 濃度はきわめて低く保たれているはずである。したがって、観察された α_1 作用が細胞内 Ca 濃度の上昇と関連している可能性は低い。事実、細胞に 20 mM という高濃度の BAPTA を負荷して Ca をさらに強力にキレートした条件下でも、同様な α_1 作用が観察された。

【考 察】

今回の実験で、モルモット心室筋においてアドレナリン性 β 受容体刺激によって活性化された Cl 電流は、 α_1 受容体刺激により抑制されることが明らかとなった。このような α_1 作用と β 作用の相互干渉は、単一チャンネルレベルでも観察された。 α_1 作用と β 作用の干渉のメカニズムについては、今までにラットの心臓でいくらか研究されている。それらの研究によると、ラットでは α_1 作用は adenylate cyclase 活性を抑えることにより β 作用に拮抗するという。事実、 α_1 作用が forskolin の効果を減弱する、また β 刺激により増加した細胞内 cyclic AMP レベルを低下させる、などの報告がある。すなわち、ラット心臓では、adenylate cyclase 活性の制御が α_1 作用と β 作用の相互干渉において鍵となる働きをしているらしい。

しかしモルモット心臓には上記の図式は当てはまらないように見える。今回の実験では、PIIE は forskolin の Cl 電流誘発効果に対して無効であった。また、GTP γ S を負荷した細胞で遷延性に活性化された Cl 電流はこれも PIIE によって影響されなかった。これらの所見は、 α_1 作用は adenylate cyclase が活性化されるより以前のステップで β 作用を抑制していることを示唆するものである。このことは、acetylcholine が adenylate cyclase を競合的に抑制して Cl 電流を抑えることと対照的である。しかし今後モルモット心臓組織で、 α_1 作用は adenylate cyclase 活性に対して直接には影響しないことを生化学的にも明らかにする必要がある。

α_1 作用の細胞内情報伝達系については不明である。今まで心臓において α_1 作用を仲介する可能性を持つものとして、イノシトール三リン酸(IP₃)、protein kinase C (PKC)、アラキドン酸代謝産物など、いろいろな物質の名前があげられており、これらの物質が今回観察された α_1 作用を仲介している可能性がある。しかし、今回の実験で細胞内 Ca を BAPTA によって強くキレートした条件下でも α_1 作用が持続したことは、例えば IP₃ の Ca 動員作用によってもたらされるような細胞内 Ca 濃度上昇はこれに関与していないことを示唆している。一方、PKC はむしろ心筋 Cl 電流を活性化することが最近明らかにされてきた。しかも、PKC は β アドレナリン-PKA 系によって活性化される Cl チャンネルと同じチャンネルを活性化するという。したがって、抑制性の α_1 作用に PKC が関与することはあり得ないように思える。いずれにせよ、 α_1 作用の細胞内情報伝達系については今後の研究で

明らかにしていく必要がある。

作用機構はこのようにまだ不明ではあるが、 α_1 作用と β 作用の相互干渉は、自律神経による心臓機能の調節のひとつの重要な側面であろう。生理的な交感神経伝達物質である noradrenarine は α_1 作用と β 作用の両方を持っているのであるから、心臓の交感神経性調節は、つねに内在性の negative feedback 機構を働かせながら機能しているのではなかろうか。このメカニズムは、有害なカテコラミン分泌過多から心臓を保護している可能性がある。

【今後の課題】

今回の実験で、モルモット心室筋の Cl⁻ 電流活性化機構において、 α_1 アドレナリン作用と β アドレナリン作用とが拮抗することが明らかとなった。その拮抗のメカニズムについては、forskolin などを用いた実験から、 α_1 作用は adenylate cyclase が活性化されるより以前のステップで β アドレナリン性情報伝達路を抑制していることが示唆されたが、それでは β 受容体刺激に続くどの反応ステップに α_1 作用が影響しているのかは不明のままである。もちろん、 β 受容体のアゴニストに対する親和性が変化した可能性も否定できない。この α_1 作用と β 作用との相互干渉は、交感神経性の臓器機能制御において生理的に重要な側面であると考えられるので、その実態を明らかにするため、上記の点について今後精力的に研究を進めていく必要がある。

また、今回観察された α_1 アドレナリン作用に関し、その情報伝達路はこれも不明のままである。一般に α_1 作用については、 β 作用ほどその情報伝達系が明らかにされておらず、さまざまな二次的仲介物質が提唱されている状況であり、今後これら仲介物質に対する特異的な抑制剤を用いた実験を行うことなどによって、その情報伝達路が同定されなければならない。

α -Adrenergic inhibition of the β -adrenoceptor-dependent chloride current
in guinea-pig ventricular myocytes

Tsuguhisa Ehara, Ikuo Iyadomi and Kenji Hirahara
*Department of Physiology, Saga Medical School,
Nabeshima 5-1-1, Saga 849, Japan*

SUMMARY

1. α_1 -Adrenoceptor-mediated inhibition of the β -adrenoceptor-dependent Cl^- current was investigated in guinea-pig ventricular myocytes with the patch clamp technique.
2. The Cl^- conductance activated by noradrenaline (0.1 to 10 μM) with an α_1 -blocker (prazosin, 5 μM) was significantly greater than that activated by noradrenaline alone. Phenylephrine and methoxamine, α_1 -agonists, exerted an inhibitory effect on the Cl^- conductance activated by isoprenaline. The dose-response relationship for isoprenaline and the Cl^- current activation, which was fitted to the Hill equation with a half-maximum concentration ($K_{1,2}$) of 28 nM in control, was shifted to higher doses in the presence of 30 μM phenylephrine; $K_{1,2}$ increased to 86 nM.
3. The interaction of α_1 - and β -agonists on Cl^- current was also observed on the single channel level; in some of the outside-out membrane patches, phenylephrine (50 μM) depressed the activity of single Cl^- channel which was induced by 5 μM adrenaline.
4. Phenylephrine was ineffective on the Cl^- conductance induced by forskolin (0.5 to 5 μM), an activator of adenylate cyclase. The Cl^- conductance persistently activated by isoprenaline in $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -loaded cells was also insensitive to phenylephrine.
5. The results suggest that the observed α_1 -adrenergic attenuation of β -adrenergic response is not primarily due to inhibition of adenylate cyclase activity. The α_1 -adrenergic action may interfere with the processes leading to the enzyme activation in the β -adrenergic pathway.
6. The phenylephrine action persisted when the capacity of intracellular Ca^{2+} -buffer was extremely increased with 20 mM BAPTA, indicating that Ca^{2+} ions are not involved in the observed α_1 -action.