

Single Channel Analysis of the Voltage-dependent Potassium Channels, NGK1 and NGK2, Expressed in Mouse Fibroblasts

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8320

マウス線維芽細胞に発現させた膜電位依存性 K⁺ チャンネル, NGK1 および NGK2 チャンネルの単一チャンネル解析

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

川 村 哲 朗

(平成4年2月4日受付)

NGK1 および NGK2 は, マウスニューロblastoma細胞とラットグリオーマ細胞との雑種細胞 NG108-15 の相補性 DNA ライブラリーからクローニングされた K⁺ チャンネル遺伝子である. 分類上, NGK1 は Shaker 関連サブファミリーに属し, NGK2 は Shaw 関連サブファミリーに属する. 両チャンネル遺伝子をそれぞれマウス線維芽細胞株 B82 にトランスフェクションし, K⁺ チャンネルを安定して発現する形質転換細胞株を樹立した. これらの細胞を用いて単一チャンネル電流の測定を行ない, NGK1 および NGK2 チャンネルの電気生理学的性質を検討した. 両チャンネルはともに膜電位依存性であった. 単一チャンネルコンダクタンスは, 細胞外 K⁺ 濃度を 5.4mM とした細胞接触パッチ (cell-attached patch) による測定から, NGK1 チャンネルでは 11pico-Siemens (pS), NGK2 チャンネルでは 18pS であった (18-20°C). 反転電位 (reversal potential) は両チャンネルが主に K⁺ に対して選択的なことを示した. 細胞外液の K⁺ 濃度を10倍変化させた場合の反転電位の変化は, NGK1 チャンネルでは 51mV, NGK2 チャンネルでは 41mV であった. この結果は, NGK2 チャンネルの K⁺ に対する選択性が比較的低いことを意味する. NGK1 と NGK2 両チャンネルは脱分極刺激により遅い不活性化を示したが, 不活性化は NGK2 においてより顕著であった. チャンネルの開状態の確率は, 常に NGK2 チャンネルの方が NGK1 チャンネルと比べて低かった. また, 開状態の膜電位閾値は, NGK1 チャンネルでは -30mV, NGK2 チャンネルでは -10mV となり, 両者では膜電位に対する感受性に相違が認められた. 両チャンネルの平均開時間は膜電位に依存し, 脱分極によって開時間の延長がみられた. しかし, 両チャンネルの膜電位依存性の様式には違いがみられた. 膜電位が 10-50mV の範囲での平均開時間は, NGK2 チャンネルのほうが常に NGK1 チャンネルより長かった. 以上のように, 2種類の K⁺ チャンネル遺伝子産物において, 電気生理学的性質の明確な相違が認められた.

Key words voltage-dependent potassium channel, fibroblast, transfection, single channel recording

K⁺ チャンネルは細胞膜蛋白の一種であり, 神経や筋など興奮性細胞をはじめ, さまざまな細胞の情報伝達において重要な役割を果たす. これまで電気生理学的に, 膜電位依存性 K⁺ チャンネル (遅延整流 delayed rectifier 型, A 電流型), 内向き整流 (inward rectifier) 型チャンネル, ATP 感受性 K⁺ チャンネル, Ca⁺⁺ 依存性 K⁺ チャンネルおよびM電流型チャンネルなどが認められている¹⁾. そのうち, 膜電位依存性 K⁺ チャンネルは, 脱分極刺激によって開き, 選択的に K⁺ を通して外向き電流を形成する. 神経系において, 膜電位依存性 K⁺ チャンネルは静止膜電位に関与する他, 活動電位の波形²⁾, 発生頻度³⁾および発生時点⁴⁾などを調節する. またこの種のチャンネルは, シナプスからの神経伝達物質の放出の調節を行なう⁵⁾. したがって膜電位依存性 K⁺ チャンネルは, 神経系における情報のコード化や統合に関与すると考えられている⁶⁾.

膜電位依存性 K⁺ チャンネル遺伝子のクローニングは, ショウジョウバエの A 電流型チャンネルをコードする Shaker 遺伝子の

同定が端緒になった⁷⁻¹⁰⁾. その後ショウジョウバエでは, Shaker 遺伝子と相同性はあるが遺伝子座の異なる3つの遺伝子 Shab, Shal および Shaw がクローニングされた¹¹⁾¹²⁾. そして現在まで, アフリカツメガエル¹³⁾, マウス¹⁴⁻¹⁷⁾, ラット¹⁸⁻²⁰⁾およびヒト²⁰⁻²³⁾からも, 多数の膜電位依存性 K⁺ チャンネル遺伝子がクローニングされた. 最近になり, 脊椎動物の K⁺ チャンネル遺伝子を, Shaker, Shab, Shal および Shaw 遺伝子産物のアミノ酸配列との相同性に基づいて, 4つのサブファミリーに分類することが提唱された²⁴⁾.

さまざまな K⁺ チャンネル遺伝子がクローニングされた結果, 膜電位依存性 K⁺ チャンネル遺伝子には多様性のあることが明らかになった. しかし, アミノ酸配列から推定されるチャンネルの高次構造には, 共通点がある. 膜電位依存性 K⁺ チャンネルは疎水性の高い領域で細胞膜を6回貫通する構造をもつ. 各貫通領域はαらせん構造を形成し, N末端側から S1-S6 とよばれている. チャンネルのN末端とC末端は細胞質側に存在する. また,

Abbreviations: cDNA, complementary deoxyribonucleic acid; CTX, charybdotoxin; DMEM, Dulbecco modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; Gohm, giga-ohm; kb, kilo-base pairs; Mohm, mega-ohm; PBS, phosphate buffered saline; pS, pico-Siemens; TEA, tetraethylammonium

S5 と S6 の連結部位は H5 あるいは SS1-SS2 とよばれ、中等度に疎水性が高く、一部が膜内に入り込む構造をもつ。K⁺ チャネルの S1 から S6 までの構造は、膜電位依存性 Na⁺ チャネルの α サブユニットや Ca²⁺ チャネルの $\alpha 1$ サブユニットで見られる 4 つの分子内繰り返し単位の 1 つに相当する。したがって膜電位依存性 K⁺ チャネルは、4 つのサブユニットからなると推定された。現在では、K⁺ チャネルは 4 つの同種または異種のサブユニット分子の会合によって形成され、その際の組み合わせの違いが、K⁺ チャネルの多様性の原因の一つになりうると考えられている^{35)~38)}。

K⁺ チャネル遺伝子のクローニングは、各種の K⁺ チャネルを独立して、アフリカツメガエルの卵母細胞³⁹⁾ や培養細胞⁴⁰⁾⁴¹⁾ に機能的に発現させることを可能にした。

また、パッチクランプ法は、発現されたチャネルの機能を分子レベルで解析することを可能にした⁴²⁾。これら 2 つの手法により、K⁺ チャネルの構造と機能との関係の研究は急速に進んでいる。

筆者の属するグループは、マウスニューロblastoma細胞とラットグリオーマ細胞との雑種細胞 NG108-15 の相補性 DNA (complementary DNA, cDNA) ライブラリーから 2 つの K⁺ チャネル遺伝子 NGK1 および NGK2 をクローニングした⁴³⁾。NGK1 は Shaker 関連サブファミリーに属し、ラットの脳由来である BK2 と相同であり、同じくラットの脳由来である RCK5 と相同性が高い。一方、NGK2 は Shaw 関連サブファミリーに属し、ラットの脳由来である RKShIII と相同である。ラットの脳由来である Kv4 は、NGK2 とのスプライシングの違いにより生じた K⁺ チャネル遺伝子である²⁶⁾。

本研究では、NGK1 および NGK2 をそれぞれマウス線維芽細胞にトランスフェクションし、K⁺ チャネルを安定して発現する形質転換細胞株を樹立した。さらにこれらの細胞から、パッチクランプ法により単一チャネル電流を測定、解析し、NGK1 および NGK2 チャネルの電気生理学的性質を検討した。

材料および方法

I. 試薬類

実験に用いた試薬および酵素は下記から得た。各種制限酵素、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I Klenow 断片、DNA リガーゼおよび大腸菌アルカリフォスファターゼ (宝酒造, 京都), ジェネチン (Geneticin, G418) (GIBCO 社, Gland Island, 米国), リポフェクチン (Lipofectin) (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, 米国)。その他の試薬で特に記載のないものは、和光純薬 (大阪) の製品を用いた。

II. 培養細胞

K⁺ チャネル遺伝子のトランスフェクションを行なった細胞はマウス線維芽細胞株 B82 である。この細胞を 5% 牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (GIBCO 社) を含有するダルベッコ変法イーグル培地 (Dulbecco modified Eagle's medium, DMEM) (GIBCO 社) にて 37°C, CO₂ 濃度 10% の環境下で培養した。

III. 組み換え DNA の作成および培養細胞へのトランスフェクション

1. 組み換え DNA の作成

K⁺ チャネル遺伝子の哺乳動物細胞発現用ベクターとして pKNHneo を用いた⁴⁴⁾。このベクターは pBR322 と pBR327 を骨格にもち、クローニング部位の上流に SV40 の初期プロモーター、下流にポリアダニレーションの情報を含む β -グロビン遺伝子の一部が挿入されている。また、形質転換細胞を選択できるようにネオマイシン (G418) 耐性遺伝子が組み込まれている。

NGK1 発現用プラスミド pKNGK1 を次のように作製した。pSPNGK1⁴⁵⁾ を SmaI で切断し、断端に HindIII リンカー dCAAGCTTG (東洋紡, 大阪) を接続後、HindIII で消化した。この反応産物を 1% アガロースゲル電気泳動にかけ、NGK1 の全領域を含む 1.8 キロ塩基対 (kilo-base pairs, kb) の断片を単離

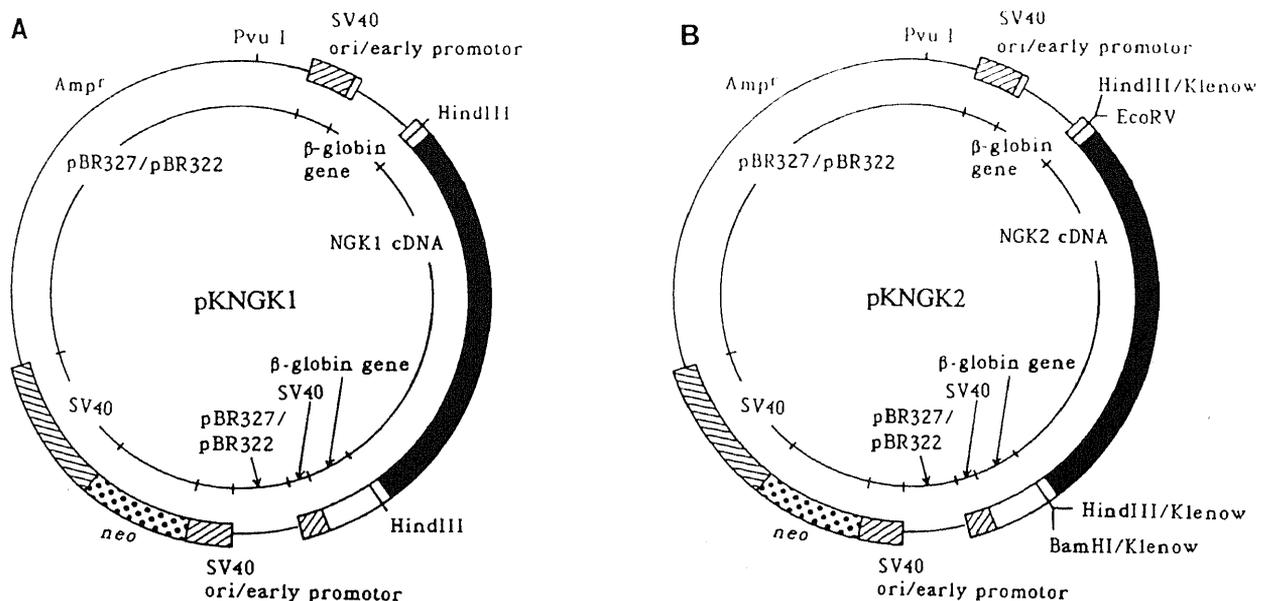


Fig. 1. Recombinant plasmids, pKNGK1 (A) and pKNGK2 (B) for expression of the cloned K⁺ channel genes in mouse fibroblast cells.

した。この断片を、pKNHneo の HindIII 部位 (大腸菌アルカリフォスファターゼ処理済み) に挿入し、順方向に挿入されたものを pKNGK1 とした (図 1A)。

NGK2 発現用プラスミド pKNGK2 の作製では、まず pSPNGK2⁴⁹ を PstI および BamHI で切断し、1.6kb の DNA 断片を 1% アガロースゲル電気泳動で単離した。この断片を pBluescript (Stratagene, California, 米国) の PstI/BamHI 部位に挿入し、できたプラスミドを pBSNGK2 とした。pBSNGK2 を BamHI で切断し、断端を大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の Klenow 断片により平滑化した後、EcoRV で切断して、1.6kb の DNA 断片を 1% アガロースゲル電気泳動で単離した。この断片を HindIII で切断した pKNHneo の断端を平滑化し、さらにアルカリフォスファターゼ処理したものに挿入した。順方向に挿入されたものを pKNGK2 とした (図 1B)。

2. 培養細胞への K⁺ チャネル遺伝子のトランスフェクション

B82 細胞を 60mm 培養皿上で、表面の 80–85% が細胞に占められる程度まで培養し、細胞を 10mM 磷酸緩衝生理食塩液 (phosphate buffered saline, PBS) により 2 回洗浄後、血清無添加の DMEM を 3ml 加え、トランスフェクション用の細胞とした。pKNGK1 および pKNGK2 それぞれ 10 μ g を滅菌蒸留水 50 μ l に溶解し、これらを 0.5 μ g/ μ l のリポフェクチン 50 μ l と静かに混和後、室温にて 15 分間放置し、DNA-リポフェクチン複合体を形成させた。これら 2 種類の複合体溶液 100 μ l を用意した細胞にそれぞれ加え、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 濃度 10% の下で 8 時間培養した。その後、無血清培地を 5% FBS 添加 DMEM と交換して、さらに 40 時間培養した。なお、対照細胞作成のために、cDNA を挿入していない pKNHneo のトランスフェクション (Sham transfection) も同時に行なった。トランスフェクション後 48 時間を経過した時点から、形質転換細胞の選択を開始した。選択培地として、G418 を最終濃度 700 μ g/ml となるように添加した DMEM を用いた。G418 存在下で 10–14 日間培養し細胞のコロニーを形成させ、NGK1 および NGK2 をトランスフェクションした細胞からそれぞれ 5 クローン (A 群) および 10 クローン (B 群) を単離した。対照細胞からは 5 クローン (C 群) を単離した。これらのクローンをホールセルパッチクランプ法⁴⁹ (whole-cell patch clamp recording) によりスクリーニングし、A 群で 5 クローン中 3 クローン、B 群で 10 クローン中 7 クローンから膜電位依存性の外向き電流が観察された。C 群では、わずかな外向き電流しか観察されなかった。A および B 群の陽性クローンに対しては、NGK1 あるいは NGK2 の全コード領域を含む cDNA をプローブにしたノーザンブロット解析を行ない、適切な長さの転写産物が生成されていることを確認した。対照細胞では、NGK1 および NGK2 のいずれの転写産物も認められなかった。以上のスクリーニングにより陽性と判断したクローンに対して、単一チャネル解析を行なった。そのうち A 群の陽性サブクローン CL1023、および B 群の陽性クローン CL301 を典型例として、結果を本文に示した。

IV. 電気生理学的方法

1. 測定条件

すべての測定は、30mm 培養皿に培養した細胞を倒立位相差顕微鏡 (日本光学、東京) のステージにのせ、室温 (18–20 $^{\circ}$ C) にて行なった。測定時に培地を 0.22 μ m フィルター (Millipore 社, Bedford, 米国) により濾過した HEPES 緩衝リンゲル液

(HEPES-buffered Ringer's solution) (in mM) (NaCl 134, KCl 5.4, MgSO₄ 0.85, NaH₂PO₄ 1.1, CaCl₂ 1.8, NaHCO₃ 5, D-glucose 5.5, HEPES 10, pH 7.2) で置換した。

2. 静止膜電位の測定

3M KCl で満たした微小ガラス電極 (Glass IBBL) (World Precision Instruments, New Haven, 米国) (10–40Mohm) を培養細胞に刺入し、微小電位用前置増幅器 (DP2–16, DIA Medical system) により静止膜電位を測定した。

3. パッチクランプ法による単一チャネル電流の測定

パッチクランプ法は Hamill ら⁴⁹の方法にしたがった。すべての測定は細胞接触パッチ (cell-attached patch) にて行なった。パッチ電極作製は、まず微小電極用ガラス管 (G 1.5) (成茂、東京) を 2 段階垂直プラー (成茂) により引き、次に、先端付近にシルポット (ダウコーニング社, 神奈川) を塗布して被膜を形成後、熱研磨を行なって作製した。電極先端の直径は 1–2 μ mm, 抵抗は 5–10Mohm だった。電極内溶液は、通常、細胞外液と同じく HEPES 緩衝リンゲル液を用いた。K⁺ に対するチャネルの選択性を調べる実験では、電極内の KCl 濃度を 2.7, 10, 30, 70 および 150mM に変化させた。増減した KCl は等モルの NaCl により置換した。したがって、電極内の 1価イオン濃度は常に一定だった。単一チャネル電流は微小電流増幅器 Axopatch-1C (Axon Instruments 社, Burlingame, 米国) により測定した。シール抵抗は 5–10giga-ohm (Gohm) であった。測定データはパルスコードモジュレーター (pulse code modulator, PCM50/ES) (ソニー、東京) を介してビデオテープレコーダー (Mastacs, Hi-fi) (日立、東京) に記録した⁴⁹。

4. データ解析

単一チャネル電流のデータは 1 kHz のローパスフィルター (–3dB, 24dB/octave) を通した後、12ビットのアナログ/デジタル変換器 (ADX-98E) (カノーブス電子、神戸) を接続したパーソナルコンピュータシステム (PC-9801RX) (日本電気、東京) によって解析した。コンピュータへのデータ取り込みの周波数 (sampling frequency) は 5 kHz または 10kHz にした。データ解析用のソフトウェアは、島根医科大学生理学教室の榎本浩一博士が開発したものを使用した。単一チャネルを流れる電流量 (current amplitude) およびチャネル開状態の確率は、電流量ヒストグラムをガウス曲線で近似し、曲線の開状態のピークの位置およびピーク近傍で曲線が囲む面積より計算した。場合によって、電流量をコンピュータ画面で手動カーサーを用いて求めた。チャネル開状態の確率は、脱分極刺激直後から約 8 秒間の現象をコンピュータに取り込んで計算した。チャネルの平均開時間 (mean open time) は開時間ヒストグラムを単一指数関数で近似し、その時定数から求めた。

成 績

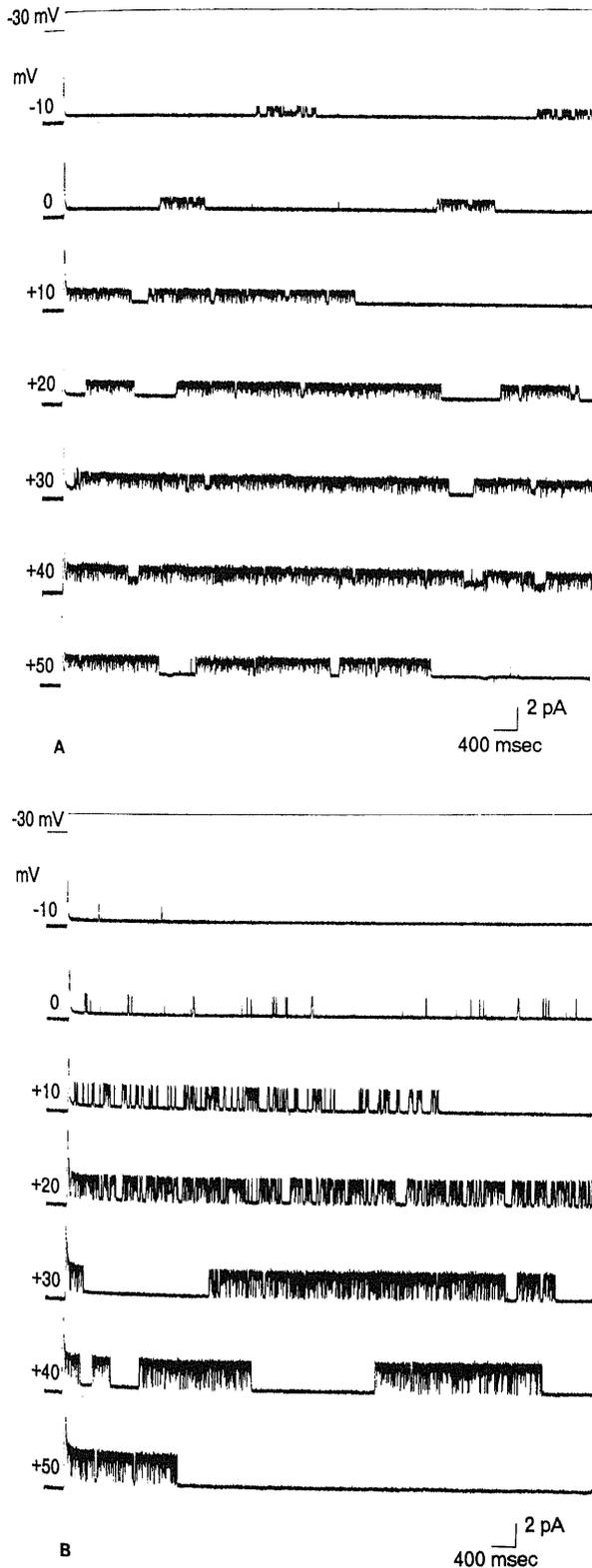
I. 静止膜電位

静止膜電位は、CL1023 において -33.1 ± 5.9 mV ($n=13$), CL301 において -34.7 ± 9.7 mV ($n=13$) であった。両者に有意差はなかった (pooled t-test, $p=0.05$)。以下の成績では、細胞の静止膜電位を -30 mV と仮定し、電位表示はすべて膜電位 (transmembrane potential) を表わすことにした。

II. 単一チャネル電流

対照細胞、つまり pKNHneo のみをトランスフェクションした細胞からは、膜電位依存性 K⁺ チャネルは測定されなかった

(n=20). CL1023 および CL301 のパッチ膜では、通常、1つから3つのレベルのチャンネル電流が観察された。それぞれのレベルの電流値は、最小レベルの電流値の整数倍であった。したがって、CL1023 および CL301 には、それぞれで同一タイプのチャンネルが発現していると考えた。図 2A, B に CL1023 および CL301 から記録した代表的な単一チャンネル電流を示す。



NGK1 および NGK2 チャンネルはともに膜電位依存性に開き、脱分極が増大するにしたがって、電流値も増大する。図 2C, D に電流値ヒストグラムの一例を示した。膜電位が 10mV のとき、開状態のピーク値は、NGK1 では 0.92pA, NGK2 では 1.70pA となり開状態の確率は明らかに NGK1 チャンネルの方が高かった。

III. 単一チャンネルコンダクタンス

NGK1 および NGK2 チャンネルの膜電位 (Vm) と電流値 (I) との関係調べた (図 3)。両チャンネルの Vm-I 関係は直線で近似できた。これは、両チャンネルの単一コンダクタンスが膜電位に非依存的であることを示す。直線の傾きから求めた単一コンダクタンスは、NGK1 チャンネルでは 11pico-Siemens (pS), NGK2 チャンネルでは 18pS であった。また、NGK1 および NGK2 チャンネルの反転電位 (reversal potential) は、それぞれ -72mV および -64mV であった。これは、両チャンネルが主に K⁺ チャンネルを通すことを示す。しかし、反転電位に差があることより、両者で K⁺ の選択性に違いがあると考えられた。

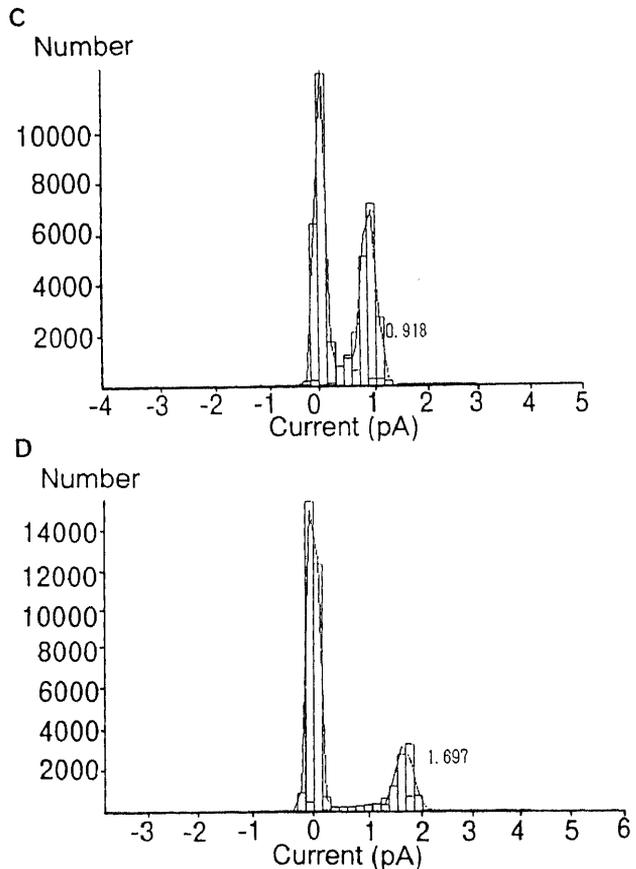


Fig. 2. Typical traces of single-channel recording in CL1023 and CL301 cells. A and B, single-channel currents recorded from CL1023 (A) and CL301 (B) at various transmembrane potentials indicated on the left in mV in cell-attached configuration. The resting membrane potential was assumed to be -30 mV. The patch pipette contained a physiological solution (134 mM NaCl, 5.4 mM KCl). The outward current is upward. C and D, amplitude histograms of the data shown in A and B, respectively, at transmembrane potential depolarized from -30 to 10 mV. The current amplitudes calculated from the peak positions in C and D are 0.918 and 1.697 pA, respectively.

IV. チャネルの K^+ 選択性

NGK1 と NGK2 との K^+ の選択性の違いを明らかにするために、細胞外液 (電極内溶液) の K^+ 濃度と反転電位との関係を調べた (図 4). 両者の片対数プロットは直線に近似することが可

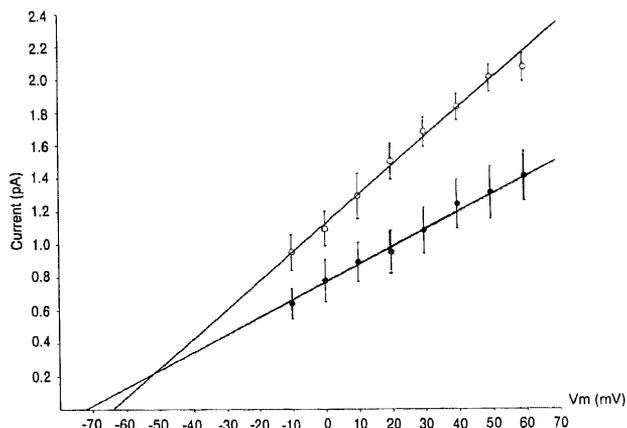


Fig. 3. Current-voltage relationships of two single NGK1 and NGK2 channels. Currents were measured from 4 to 10 patches. V_m denotes transmembrane potential. Filled (●) and open (○) circles represent the mean unitary current of CL1023-NGK1 and CL301-NGK2 channels, respectively. Solid lines represent linear regressions fitted to data points, and bars indicate standard deviations.

能であり、細胞外の K^+ 濃度が増加するにしたがって、反転電位は正の方向へ移動した。この関係は両チャネルが主に K^+ に対して選択性をもつことを示す。 K^+ 濃度を10倍変化させたときの反転電位の変化は、NGK1 では 51mV, NGK2 では 41mV であった。20℃の条件下で Nernst 方程式から推定される反転電位の変化は 58.2mV であり、この値や NGK1 チャネルの値と比較して、NGK2 チャネルの値は低い。これは、NGK2 チャネルの K^+ チャネルに対する選択性が低いことを示唆する。

V. チャネルの不活性化過程

チャネルの不活性化、特に数秒間にわたって起こる遅い成分を見るため、長時間の脱分極刺激によるチャネル電流を調べた。図 5 に過分極 (膜電位 $-60mV$) の状態から $90mV$ の脱分極を約 5 秒間、20 秒間隔で加えた場合の、NGK1 および NGK2 のチャネル電流のトレースと、その加算平均によるチャネル電流の再構成を示す。NGK1 による電流は脱分極刺激の間、遅い小さな減衰を示し、刺激開始 4 秒後の減衰率は 40% 程度だった。一方、NGK2 による電流は、遅い大きな減衰を示し、刺激開始 4 秒後の減衰率は 80% に達した。この結果より、両チャネル電流には、遅い不活性化の成分が存在するが、不活性化の程度は、NGK2 チャネルにおいて著明であるといえる。

VI. チャネルの活性化過程

チャネル活性化の動態を調べるため、静止膜電位から脱分極刺激を段階的に加えたときのチャネル開状態の確率の変化を求

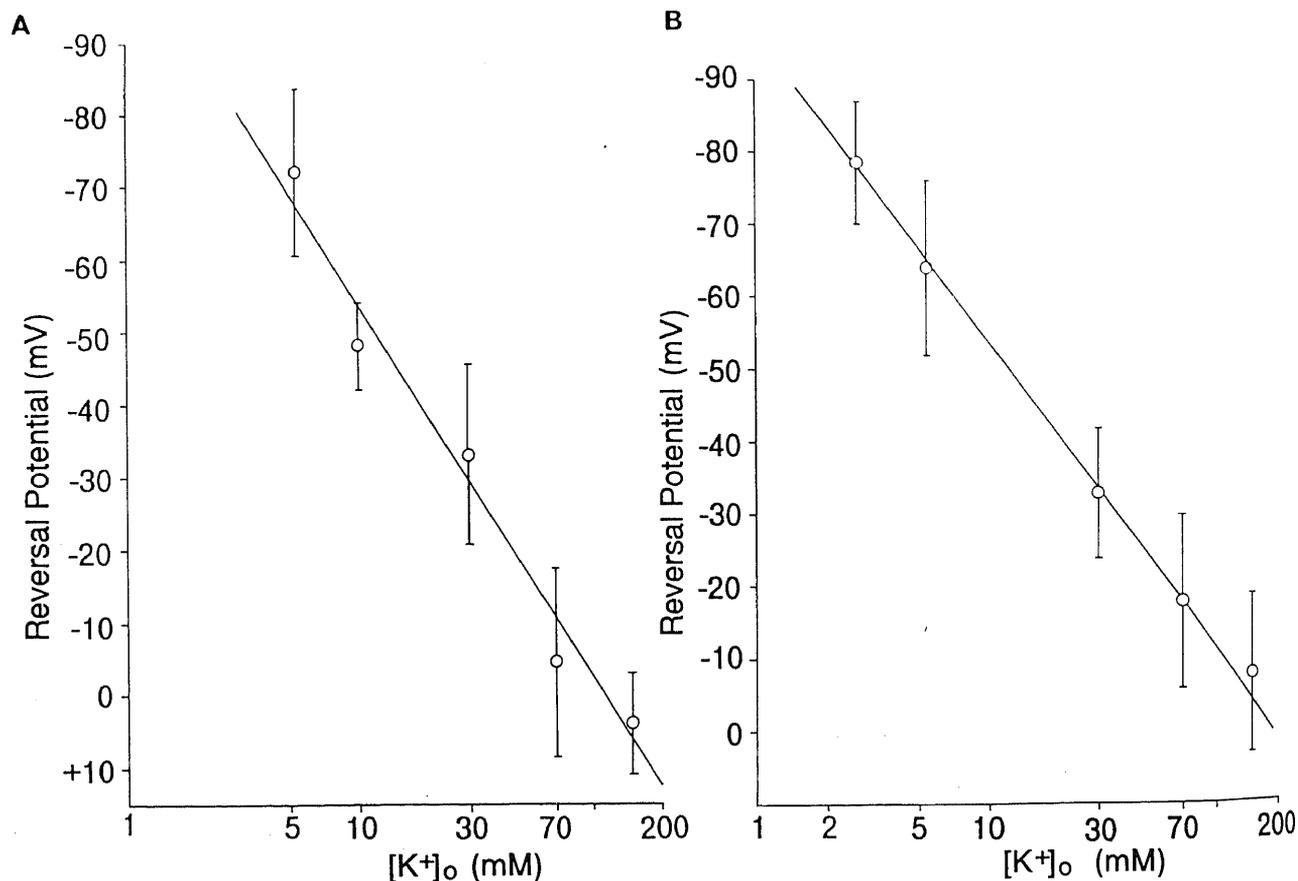


Fig. 4. Relationships between extracellular K^+ and reversal potentials for NGK1 and NGK2 channels. Reversal potentials of NGK1 (A) and NGK2 (B) were plotted as a function of extracellular K^+ concentration. Each circle represents the mean reversal potential derived from current-voltage relationships ($n=3$ to 11) and bars indicate standard deviations. Solid lines are linear regressions fitted to the data points.

めた。図6に、膜電位と刺激直後から8秒間のチャネル開状態の確率との関係を示す。NGK1 チャネルでは、 -30mV が閾値となって開状態が出現し、 -10mV から 10mV の間ではほぼ直線的に確率が上昇し、 10mV を越えると確率はほぼ一定になった。一方、NGK2 チャネルでは、 -10mV が閾値となって開状態が出現し、 0mV から 20mV の間ではほぼ直線的に確率が上昇し、 20mV を越えると確率はほぼ一定になった。両者を比較すると、常に NGK2 チャネルの開状態の確率が NGK1 チャネルと比べて低かった。また、チャネルが活性化するのに、NGK2 チャネルの方がより大きな脱分極を必要とした。

Ⅵ. チャネルの平均開時間

チャネルの不活性化および開状態の確率は、チャネルの開時間の分布と関係がある。図7A-D は膜電位を 20mV 、 40mV に脱分極したときの開時間のヒストグラムである。ヒストグラムより計算した平均開時間と膜電位との関係を図7E で示した。

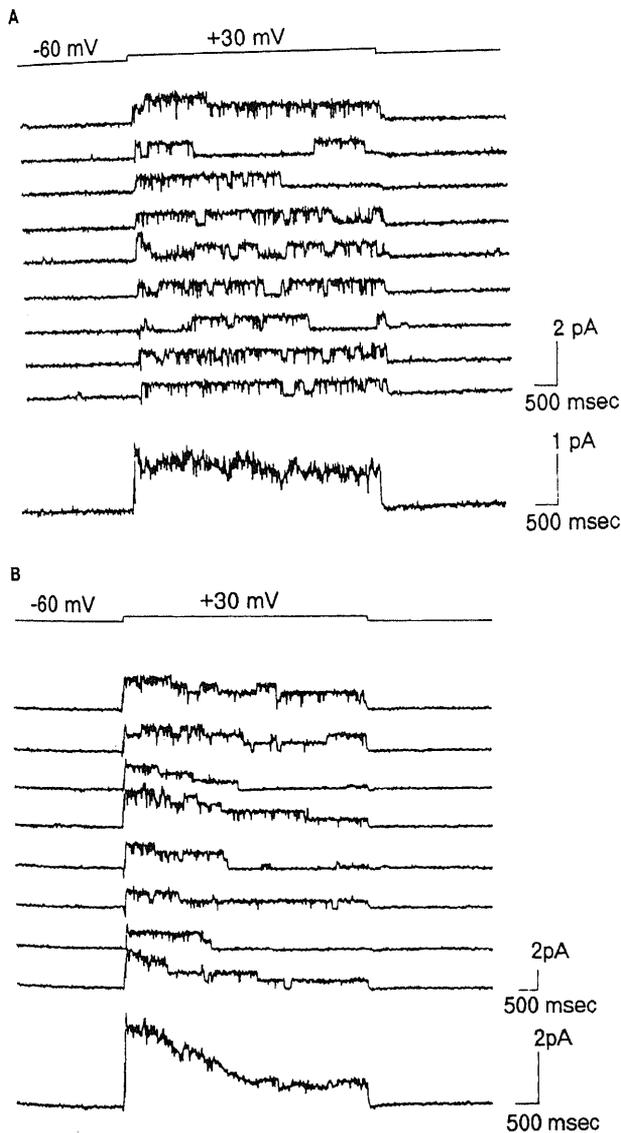


Fig. 5. Time courses of inactivation of NGK1 and NGK2 channels. In each panel (A, NGK1; B, NGK2), a voltage step (Top), 8-9 traces of channel currents (Middle) and an ensemble average (Bottom) are shown. Voltage steps were applied for 5 sec from -60mV to $+30\text{mV}$ at 20 sec interval.

両チャネルの平均開時間はともに膜電位依存性であり、膜電位が高くなるにしたがって開時間は延長した。さらに、NGK1 チャネルの膜電位に対する平均開時間の分布は、直線で近似できたが、NGK2 チャネルでは、非直線の関係になった。また、開時間は膜電位 10mV から 60mV の範囲で、常に NGK2 チャネルのほうが NGK1 チャネルより長かった。これらの結果は、両者の不活性化機構に相違があることを示唆する。

考 察

2種類の K^+ チャネル遺伝子 NGK1 および NGK2 は、NG108-15 細胞の cDNA ライブラリーから、マウスの脳由来の K^+ チャネル MBK1 の一部をプローブに用いてクローニングされた⁴⁾。NG108-15 細胞はマウスニューロblastoma 細胞株 N18TG-2 とラットグリオーマ細胞株 C6Bu-1 とをセンダイウイルスによって融合させた雑種細胞であり、サイクリック AMP や プロスタグランジン E_1 などで分化させると、さまざまなイオン電流を観察できる。そのうち、 K^+ 電流では、遅延整流、M電流、 Ca^{++} 依存性電流および一過性外向き電流などが報告された^{45,47)}。また、NG108-15 の親細胞であるニューロblastoma 細胞でも膜電位依存性 K^+ 電流や Ca^{++} 依存性 K^+ 電流が確認された⁴⁸⁾。したがって、NGK1 あるいは NGK2 チャネルによる電流は、これまでに報告された NG108-15 細胞やニューロblastoma 細胞の膜電位依存性 K^+ 電流の構成要素をなすと考えられる。

膜電位依存性 K^+ チャネル遺伝子が次々とクローニングされた結果、チャネルの電気生理学的諸性質とチャネル蛋白の高次構造との関連が解明されつつある。そこで、本実験で観察されたチャネルの性質とチャネル構造との関連について推察する。

単一チャネルコンダクタンスは、NGK1 では 11pS 、NGK2 では 18pS となり、両者で明らかな差が認められた。また、 K^+ に対する選択性において、NGK2 チャネルは NGK1 チャネルと比べて低い選択性を示した。チャネルコンダクタンスと K^+ 選択性は、イオンの通過孔の構造に規定される。したがって、 K^+ チャネル蛋白のどの部位が通過孔を形成するかは、重

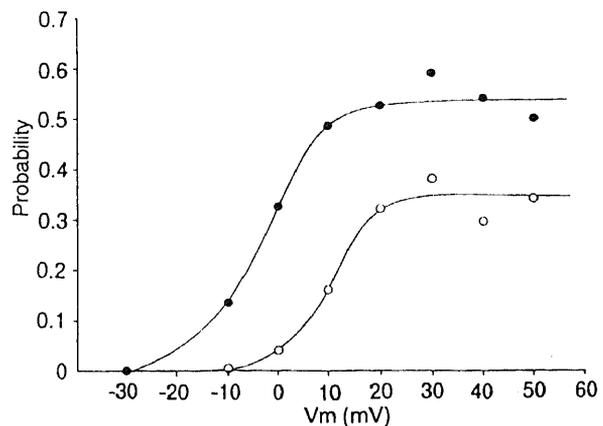
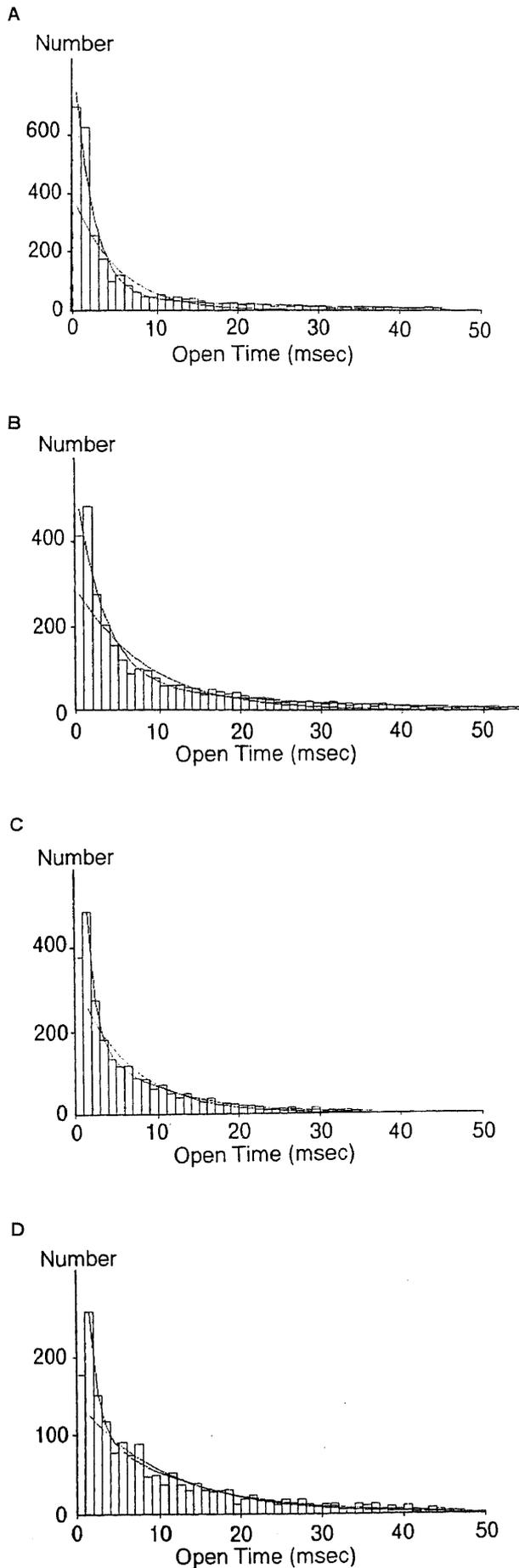


Fig. 6. Activation kinetics of NGK1 and NGK2 channels. The probabilities of NGK1 (●) and NGK2 (○) channels being open at various depolarization steps. V_m denotes transmembrane potential. Current data were sampled for about 8 sec after the application of voltage step as in Fig. 2.



要な問題だった。最近になり、 K^+ チャネルの孔構造が H5 (SS1-SS2) 領域であることが判明した。Mackinnon ら⁴⁹ は、 K^+ チャネルを遮断するサソリ毒シャリブドトキシン (charybdotoxin, CTX) の結合部位に着目して、H5 領域に対して部位指向性変異誘発 (site-directed mutagenesis) の実験を行なった。その結果、CTX の結合に影響を与えるアミノ酸は H5 の両側に集中していた。したがって、この部分がチャネル孔の細胞外側に位置することを示唆した。さらに Yellen ら⁵⁰ は、 K^+ チャネル遮断剤テトラエチルアンモニウム (tetraethylammonium, TEA) を用いて同様の実験を行なった。その結果、H5 両側のアミノ酸を変異させると、細胞外側からの TEA に対する感受性が変化する一方、H5 の中央付近のアミノ酸を変異させると、細胞質側からの TEA に対する感受性が変化した。この事実は、H5 が細胞膜を 2 回横切る構造をとることを示唆した。一方、Hartmann ら⁵¹ は、単一チャネルコンダクタンスと細胞内外の TEA に対する感受性が明確に異なる 2 つの K^+ チャネル DRK1 と NGK2 とのキメラチャネルを解析した。DRK1 の S5-S6 連結部を NGK2 の同部位と置換したキメラチャネルでは、2 つの性質はいずれも NGK2 チャネルのものと同しくなった。また Yool ら⁵² は、Shaker チャネルの H5 領域の部位指向性変異誘発の実験を行ない、イオン選択性が変化することを報告した。H5 のただ 1 つのアミノ酸を変異させることで、 K^+ と比べて直径の小さい Na^+ を排除する性質は不変だったが、 K^+ と比べて直径の大きい NH_4^+ 、 Rb^+ に対する選択性は増大した。 K^+ に対する選択性は不変だった。以上の結果より、H5 は K^+ チャネルのイオン通過孔の内側壁を形成すると考えられた。

そこで、NGK1 と NGK2 の H5 領域を、他の K^+ チャネルとともに比較してみた (図 8A)。NGK1 と NGK2 とでは、H5

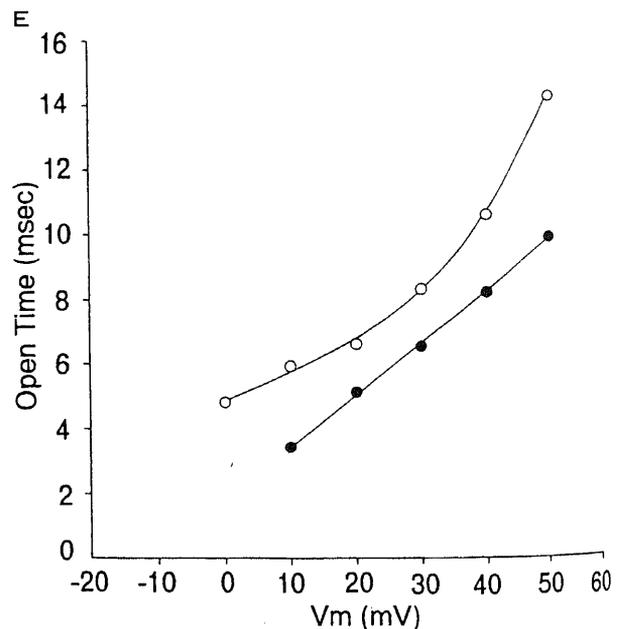


Fig. 7. Open-time analysis of NGK1 and NGK2 channels. The open-time histograms of NGK1 (A, B) and NGK2 (C, D) channels at transmembrane potential of 20 mV (A, C) and 40 mV (B, D). Each histogram is sum of histograms obtained from 4 to 6 experiments. E, Mean open time-voltage relationships of NGK1 (●) and NGK2 (○) channels.

後部の8アミノ酸残基のうち5つに相違がみられる。Hartmann ら⁵¹⁾は、S6の手前の21残基がチャンネル孔形成に関与すると推定しており、これにしたがえば、NGK1チャンネルとNGK2チャンネルとのコンダクタンスおよびK⁺選択性の違いは、S6の手前の数アミノ酸残基が関与している可能性がある。

NGK1チャンネルとNGK2チャンネルとでは、活性化の膜電位閾値に差がみられ、チャンネルが開状態をとるためには、NGK2チャンネルの方が大きい脱分極を必要とした。膜電位依存性Na⁺、Ca²⁺およびK⁺チャンネルには共通したS4領域がある。S4は、正電荷を帯びたアルギニンやリジン残基が3つおきに6から7回出現する特徴的な構造をしており、電圧感知部位(voltage sensor)といわれていた⁵³⁾。Papazian ら⁵⁴⁾は、Shaker BチャンネルのS4の7つの正電荷アミノ酸残基を、電気的に中性なアミノ酸残基や正電荷をもつ他のアミノ酸残基と1つずつ置換して、S4の機能を検討した。その結果、1) S4の7つの正電荷アミノ酸残基のうち特定のものが、膜電位依存性に関与すること2) チャンネルの活性化は正電荷アミノ酸と膜内の電場との関係だけでは説明できないこと3) S4以外の正電荷アミノ酸残基も膜電位依存性に関与することなどを指摘した。また、Liman ら⁵⁵⁾は、ラット由来のRCK1チャンネルを用いて、

A.			S6
H5	<i>ShakerB</i>	DAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGFWGKI	
	<i>NGK1</i>	-----S-----V-TTIG---	
	<i>NGK2</i>	IG-----L-----Y-QTWS-ML	
	<i>Shaw</i>	LGL---L-----A-KTYI-MF	
	<i>DRK1</i>	AS----TI-----IY-KTLL---	
B.			
S4	<i>Shaker B</i>	ILRVIRLVRFRIKLSRHSKGL	
	<i>NGK1</i>	--R--R--R--R--K--R--K--	
	<i>RCK1</i>	--R--R--R--R--K--R--K--	
	<i>NGK2</i>	F-R-VRF-RILR--K-TR-FV--	
	<i>Shaw</i>	--EFFSIIRIMRL-KVTR--S--	
	<i>Shab</i>	VVQ-FRIMRILRVLK-AR--T--	
	<i>Shal</i>	AFVTLRVFR--R--KF-R--Q--	
C.			
S6	<i>ShakerA</i>	IVGSLC VVAGVLTIALPVPVIV	
	<i>ShakerB</i>	-----AI-----	
	<i>NGK1</i>	-----AI-----	
	<i>NGK2</i>	L--A--AL-----M-----	

Fig. 8. Amino acid sequence alignment of H5 (A), S4 (B) and S6 (C) regions of various voltage-dependent K⁺ channel proteins. A dash represents the same amino acid as the top. Abbreviations for the amino acid residues are: A, alanine; C, cysteine; D, aspartic acid; E, glutamic acid; F, phenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine; K, lysine; L, leucine; M, methionine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptophan; Y, tyrosine.

S4内の正電荷アミノ酸残基がゲート電流に関与することを量的に証明した。かれらも、S4内の特定のアルギニン残基がチャンネルのゲート機構に重要なことを明らかにした。NGK1とNGK2のS4のアミノ酸配列を、他のK⁺チャンネルとともに比較してみると(図8B)、NGK1で7番目に出現する正電荷アミノ酸リジン残基がNGK2ではバリン残基になっている。両者の電荷アミノ酸の違いはこの一点だけであるが、同じ位置ではShab, Shal および Shaw でも正電荷になっていない。ところが、Shab および Shal チャンネルの活性化閾値はShakerチャンネルとはほぼ等しく、Shawチャンネルではむしろ低いと報告されている¹²⁾。したがって、NGK1とNGK2両チャンネル間の活性化閾値の相違を、S4の正電荷アミノ酸の違いで説明することはできないと考える。なお、S4の配列で特徴的なのはNGK2に関連のあるShawであり、S4内で正電荷アミノ酸の繰り返しは4回しかなく、さらに、通常アルギニン残基が出現する1番目の位置に負電荷をもつグルタミン酸残基がある。Shawチャンネルの電流の特徴は、活性化閾値がShaker, Shab および Shalチャンネルより低く-70mVから-80mVであり、また定常的不活性化(steady-state inactivation)がみられないことである¹²⁾。この性質は、チャンネル構造の閉状態における安定性という点からみると、Shawは閉状態が不安定であり、開状態になると構造的に安定するといえる。一方、活性化閾値が比較的高く、明らかな不活性化を示すNGK2チャンネルは、閉状態は安定だが、開状態になると構造が不安定になると考えられる。

チャンネルの不活性過程を検討した結果、NGK1およびNGK2チャンネルには数秒間で起こる遅い不活性化がみられたが、経時的にみた場合の電流の減衰は、NGK2チャンネルの方が顕著だった。これは、チャンネルの不活性化に関与する構造が、両者の間で異なることを示唆する。NGK1チャンネルと関連のあるShakerチャンネルには、不活性化過程に2つの成分がある。1つは数ミリ秒間で起こる速い成分であり、もう1つは数秒間観察される遅い成分である。Hoshi ら⁵⁶⁾は、Shaker BチャンネルのN末端の最初の19個のアミノ酸の欠失や変異により、速い不活性化が阻害されることを示した。また、この19個のアミノ酸に続く領域を長くすると不活性化が遅延し、短くすると不活性化が加速した。さらにZagotta ら⁵⁷⁾は、このN末端のアミノ酸配列と同じペプチドを、N末端の欠失したShaker Bチャンネルの細胞質側に作用させると、速い不活性化が回復することを確認した。これらの実験事実は、Armstrong ら⁵⁸⁾の提唱したボールと鎖モデル(ball and chain model)に適合した。つまり、チャンネルにつながったN末端のボール構造がチャンネルの孔を細胞質側から塞ぐことで、急速な不活性化が起こると考えられた。その後、Isacoff ら⁵⁹⁾は、ボール構造を受けとめる受容体構造がS4とS5との間(S4-S5 loop)にあることを示唆した。この部分はチャンネル孔に近接し、不活性化だけでなくチャンネルコンダクタンスにも関与すると考えられた。NGK1とNGK2のN末端領域には、Shaker Bのボールに相当するようなアミノ酸配列はみられない。また、両チャンネルにはA電流のような速い不活性化はない。この事実はボールと鎖モデルに矛盾するものではない。

不活性化の遅い成分はN末端を排除しても保存される。したがって、この成分にはN末端以外の構造が関与すると予想された。Hoshi ら⁶⁰⁾は、Shaker Bチャンネルでみられる遅い不活性化にS6が関与することを報告した。ここでNGK1, NGK2, 遅い

不活性化のない Shaker A および遅い不活性化のある Shaker B の S6 のアミノ酸配列を比較すると (図 8C), Shaker A と Shaker B とでは, 2 つのアミノ酸残基 (ShA: VV, ShB: AI) が異なる. Hoshi らは部位指向性変異誘発の実験から, これら 2 つのアミノ酸残基のうち Shaker B のアラニン残基が遅い不活性化に関与することを明らかにした. NGK1 と Shaker B の S6 構造は相同であり, NGK1 チャネルの遅い不活性化は Shaker B チャネルと同じ機構で起こる可能性が高い. NGK2 においては, NGK1 と比較すると 4ヶ所のアミノ酸残基が異なっている. これらの違いが, 両チャネルの不活性化の違いの原因になるかは, 今のところ不明である. VanDongen ら⁹⁾は, Shab 関連チャネル DRK1 の C 末端を欠失させると遅い不活性化が変化することを観察した. これは, K⁺ チャネルによっては, 不活性化に S6 以外の構造も関与することを示唆する. C 末端に注目すると, NGK2, Shaw および Kv4 など Shaw 関連サブファミリーに属する K⁺ チャネルでは, S6 に近い位置で正電荷アミノ酸残基が 5 つ連続する特徴的配列が認められる⁹⁾. その機能的意義は不明だが, 不活性化との関連に興味をもたれる. この問題を含め K⁺ チャネルの構造と機能との関連をさらに解明するには, 部位指向性変異誘発やキメラチャネルなどの実験が必要と考える. また, 今後の課題として, 分子レベルで解明された K⁺ チャネルが, 実際の生体内でいかなる意義を有するかを明らかにする必要がある.

結 論

2 種類の K⁺ チャネル遺伝子 NGK1 と NGK2 を, マウス線維芽細胞株 B82 にトランスフェクションし, それぞれの遺伝子産物を安定に発現する変異細胞株を樹立した. これらの細胞を用いて, NGK1 および NGK2 チャネルの単一チャネル電流を測定し, 以下の結論を得た.

1. 単一チャネルコンダクタンスは, 細胞外液と電極内の K⁺ 濃度を 5.4mM とした細胞接触パッチにおいて, NGK1 チャネルでは 11pS, NGK2 チャネルでは 18pS であった.
2. NGK2 チャネルの K⁺ 選択性は, NGK1 チャネルと比べて低かった.
3. 数秒間にわたる脱分極刺激によって, 両チャネルは共に遅い不活性化を示した. この不活性化は NGK2 チャネルにおいて顕著であった.
4. チャネル活性化の膜電位閾値は, NGK2 チャネルの方が NGK1 チャネルより高かった. またチャネル開状態の確率は, 常に NGK2 チャネルの方が NGK1 チャネルより低かった.
5. 両チャネルの平均開時間は膜電位に依存した. しかし, 膜電位依存性の様式には両者で相違が認められた. NGK2 チャネルの平均開時間は NGK1 チャネルより長かった.

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します. また, 終始直接の御指導を賜りました金沢大学神経情報研究施設神経物性部門の東田陽博教授に心から感謝致します. さらに多大なる, 御助力と御助言を頂いた, 神経物性部門の横山茂助手並びに島根医科大学生理学第二講座の榎本浩一助手に深く感謝致します. また, 御支援と御協力頂きました金沢大学医学部脳神経外科学教室並びに神経情報研究施設の皆様に感謝致します. この研究の一部は医学部特別設備「総合核酸検査システム」の機器を使用して行なった. 本論文の要旨は, 20th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (1990, St. Louis, 米国) において発表された.

文 献

- 1) Hille, B.: Ionic Channels of Excitable Membranes, 2nd ed., p115-139, Sinauer Associates Inc., Massachusetts, 1992.
- 2) Kaczmarek, L. K. & Strumwasser, F.: A voltage clamp analysis of currents underlying cAMP-induced membrane modulation of isolated peptidergic neurons of Aplysia. *J. Neurophysiol.*, **52**, 340-349 (1984).
- 3) Segal, M., Rogawski, M. A. & Barker, J. L.: A transient potassium conductance regulates the excitability of cultured hippocampal and spinal neurones. *J. Neurosci.*, **4**, 604-609 (1984).
- 4) Getting, P.: Mechanisms of pattern generation underlying swimming in Tritonia. III. Intrinsic and synaptic mechanisms for delayed excitation. *J. Neurophysiol.*, **49**, 1036-1050 (1983).
- 5) Cassell, J. F. & McLachlan, E. M.: The effect of a transient outward current (I_A) on synaptic potentials in sympathetic ganglion cells of the guinea pig. *J. Physiol.*, **374**, 273-288 (1986).
- 6) Nelson, T. J., Collin, C. & Alkon, D. L.: Isolation of a G protein that is modified by learning and reduces potassium currents in Hermissenda. *Science*, **247**, 1479-1483 (1990).
- 7) Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from Drosophila. *Science*, **237**, 749-753 (1987).
- 8) Tempel, B. L., Papazian, D. M., Schwarz, T. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Sequence of a probable potassium channel component encoded at Shaker locus of Drosophila. *Science*, **237**, 770-775 (1987).
- 9) Kamb, A., Iverson, L. E. & Tanouye, M. A.: Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell*, **50**, 405-413 (1987).
- 10) Baumann, A., Krah-Jentgens, I., Müller, R., Müller-Holtkamp, F., Seidel, R., Kecskemethy, N., Casal, J., Ferrus, A. & Pongs, O.: Molecular organization of the maternal effect region of the Shaker complex of Drosophila: characterization of an I_A channel transcript with homology to vertebrate Na⁺ channel. *EMBO J.*, **6**, 3419-3429 (1987).
- 11) Butler, A., Wei, A., Baker, K. & Salkoff, L.: A family of putative potassium channel genes in Drosophila. *Science*, **243**, 943-947 (1989).
- 12) Wei, A., Covarrubias, M., Butler, A., Baker, K., Pak, M. & Salkoff, L.: K⁺ current diversity is produced by an extended gene family conserved in Drosophila and mouse. *Science*, **248**, 599-603 (1990).
- 13) Ribera, A. B.: A potassium channel gene is expressed at neural induction. *Neuron*, **5**, 691-701 (1990).
- 14) Tempel, B. L., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature*, **332**, 837-839 (1988).
- 15) Chandy, K. G., Williams, C. B., Spencer, R. H.,

- Aguilar, B. A., Ghanshani, S., Tempel, B. L. & Gutman, G. A.: A family of three mouse potassium channel genes with intronless coding regions. *Science*, **247**, 973-975 (1990).
- 16) Grissmer, S., Dethlefs, B., Wasmuth, J. J., Goldin, A. L., Gutman, G. A., Cahalan, M. D. & Chandy, K. G.: Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 9411-9415 (1990).
- 17) Pak, M. D., Baker, K., Covarrubias, M., Butler, A., Ratcliffe, A. & Salkoff, L.: mShal, a subfamily of A-type K⁺ channel cloned from mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 4386-4390 (1991).
- 18) Baumann, A., Grupe, A., Ackermann, A. & Pongs, O.: Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. *EMBO J.*, **7**, 2457-2463 (1988).
- 19) Christie, M. J., Adelman, J. P., Douglass, J. & North, R. A.: Expression of a cloned rat brain potassium channel in *Xenopus* oocytes. *Science*, **244**, 221-224 (1989).
- 20) McKinnon, D.: Isolation of a cDNA clone coding for a putative second potassium channel indicates the existence of a gene family. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8230-8236 (1989).
- 21) Paulmichl, M., Nasmith, P., Hellmiss, R., Reed, K., Boyle, W. A., Nerbonne, J. M., Peralta, E. G. & Clapham, D. E.: Cloning and expression of a rat cardiac delayed rectifier potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7892-7895 (1991).
- 22) Stühmer, W., Ruppersberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Giese, K. P., Perschke, A., Baumann, A. & Pongs, O.: Molecular basis of functional diversity of voltage gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J.*, **8**, 3235-3244 (1989).
- 23) Kirsch, G. E., Drewe, J. A., Verma, S., Brown, A. M. & Joho, R. H.: Electrophysiological characterization of a new member of the RCK family of rat brain K⁺ channels. *FEBS Lett.*, **278**, 55-60 (1991).
- 24) Swanson, R., Marshall, J., Smith, J. F., Williams, J. B., Boyle, M. B., Folander, K., Luneau, C. J., Antanavage, J., Oliva, C., Buhrow, S. A., Bennett, C., Stein, R. B. & Kaczmarek, L. K.: Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron*, **4**, 929-939 (1990).
- 25) Luneau, C. J., Williams, J. B., Marshall, J., Levitan, E. S., Oliva, C., Smith, J. F., Antanavage, J., Folander, K., Stein, R. B., Swanson, R., Kaczmarek, L. K. & Buhrow, S. A.: Alternative splicing contributes to K⁺ channel diversity in the mammalian central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3932-3936 (1991).
- 26) McCormack, T., Vega-Saenz de Miera, E. C. & Rudy, B.: Molecular cloning of a member of a third class of Shaker-family K⁺ channel gene in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5227-5231 (1990).
- 27) Schröter, K.-H., Ruppersberg, J. P., Wunder, F., Rettig, J., Stocker, M. & Pongs, O.: Cloning and functional expression of a TEA-sensitive A-type potassium channel from rat brain. *FEBS Lett.*, **278**, 211-216 (1991).
- 28) Frech, G. C., VanDongen, A. M. J., Schuster, G., Brown, A. M. & Joho, R. H.: A novel potassium channel with delayed rectifier properties isolated from rat brain by expression cloning. *Nature*, **340**, 642-645 (1989).
- 29) Betsholtz, C., Baumann, A., Kenna, S., Ashcroft, F. M., Ashcroft, S. J. H., Berggren, P.-O., Grupe, A., Pongs, O., Rorsman, P., Sandblom, J. & Welsh, M.: Expression of voltage-gated K⁺ channels in insulin-producing cells. *FEBS Lett.*, **263**, 121-126 (1990).
- 30) Kamb, A., Weir, M., Rudy, B., Varmus, H. & Kenyon, C.: Identification of genes from pattern formation, tyrosine kinase, and potassium channel families by DNA amplification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 4372-4376 (1989).
- 31) Philipson, L. H., Hice, R. E., Schaefer, K., LaMendola, J., Bell, G. I., Nelson, D. J. & Steiner, D. F.: Sequence and functional expression in *Xenopus* oocytes of a human insulinoma and islet potassium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 53-57 (1991).
- 32) Grupe, A., Schröter, K. H., Ruppersberg, J. P., Stocker, M., Drewes, T., Beckh, S. & Pongs, O.: Cloning and expression of a voltage-gated potassium channel. A novel member of the RCK potassium channel family. *EMBO J.*, **9**, 1749-1756 (1990).
- 33) Tamkun, M. M., Knoth, K. M., Walbridge, J. A., Kroemer, H., Roden, D. M. & Glover, D. M.: Molecular cloning and characterization of two voltage-gated K⁺ channel cDNAs from human ventricle. *FASEB J.*, **5**, 331-337 (1991).
- 34) Chandy, K. G.: Simplified gene nomenclature. *Nature*, **352**, 26 (1991).
- 35) Christie, M. J., North, R. A., Osborne, P. B., Douglass, J. & Adelman, J. P.: Heteropolymeric potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes from cloned subunits. *Neuron*, **2**, 405-411 (1990).
- 36) Isacoff, E. Y., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channels in *Xenopus* oocytes. *Nature*, **345**, 530-534 (1990).
- 37) Ruppersberg, J. P., Schröter, K. H., Sakmann, B., Stocker, M., Sewing, S. & Pongs, O.: Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium-channel proteins. *Nature*, **345**, 535-537 (1990).
- 38) MacKinnon, R.: Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel. *Nature*, **350**, 232-235 (1991).
- 39) Timpe, L. C., Schwarz, T. L., Tempel, B. L., Papazian, D. M., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Expression of functional potassium channels from Shaker cDNA in *Xenopus* oocytes. *Nature*, **331**, 143-145 (1988).
- 40) Leonard, R. J., Karschin, A., Jayashree-Aiyar, S., Davidson, N., Tanouye, M. A., Thomas, L., Thomas, G.

- & Lester, H. A.: Expression of *Drosophila* Shaker potassium channels in mammalian cells infected with recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86**, 7629-7633 (1989).
- 41) Koren, G., Liman, E. R., Logothetis, D. E., Nadal-Ginard, B. & Hess, P.: Gating mechanism of a cloned potassium channel expressed in frog oocytes and mammalian cells. *Neuron*, **2**, 39-51 (1990).
- 42) Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. & Sigworth, F. J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100 (1981).
- 43) Yokoyama, S., Imoto, K., Kawamura, T., Higashida, H., Iwabe, N., Miyata, T. & Numa, S.: Potassium channels from NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. Primary structure and functional expression from cDNAs. *FEBS Lett.*, **259**, 37-42 (1989).
- 44) Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Mishina, M. & Numa, S.: Selective coupling with K⁺ currents of muscarinic acetylcholine receptor subtypes in NG108-15 cells. *Nature*, **335**, 355-358 (1988).
- 45) Brown, D. & Higashida, H.: Voltage- and calcium-activated potassium currents in mouse neuroblastoma × glioma hybrid cells. *J. Physiol.*, **397**, 149-165 (1988).
- 46) Bezanilla, F.: A high capacity data recording device based on a digital audio processor and a video cassette recorder. *Biophys. J.*, **47**, 437-441 (1985).
- 47) Robbins, J. & Sim, J. A.: A transient outward current in NG108-15 neuroblastoma × glioma hybrid cells. *Pflügers Arch.*, **416**, 130-137 (1990).
- 48) Quandt, F. N.: Three kinetically distinct potassium channels in mouse neuroblastoma cells. *J. Physiol.*, **395**, 401-408 (1988).
- 49) MacKinnon, R., Heginbotham, L. & Abramson, T.: Mapping the receptor site for charybdotoxin, a pore-blocking potassium channel inhibitor. *Neuron*, **5**, 767-771 (1990).
- 50) Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T. & MacKinnon, R.: Mutations affecting internal TEA Blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science*, **251**, 939-941 (1991).
- 51) Hartmann, H. A., Kirsch, G. E., Drewe, J. A., Tagliatela, M., Joho, R. H. & Brown, A. M.: Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. *Science*, **251**, 942-944 (1991).
- 52) Yool, A. J. & Schwarz, T. L.: Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature*, **349**, 700-704 (1991).
- 53) Catterall, W. A.: Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science*, **242**, 50-61 (1988).
- 54) Papazian, D. M., Timpe, L. C., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Alteration of voltage-dependence of Shaker potassium channel by mutations in the S4 sequence. *Nature*, **349**, 305-310 (1991).
- 55) Liman, E. R., Hess, P., Weaver, F. & Koren, G.: Voltage-sensing residues in the S4 region of a mammalian K⁺ channel. *Nature*, **353**, 752-756 (1991).
- 56) Hoshi, T., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W.: Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. *Science*, **250**, 533-538 (1990).
- 57) Zagotta, W. N., Hoshi, T. & Aldrich, R. W.: Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. *Science*, **250**, 568-571 (1990).
- 58) Armstrong, C. M. & Bezanilla, F.: Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J. Gen. Physiol.*, **70**, 567-590 (1977).
- 59) Isacoff, E. Y., Jan, Y. N. & Jan, L. Y.: Putative receptor for the cytoplasmic inactivation gate in the Shaker K⁺ Channel. *Nature*, **353**, 86-90 (1991).
- 60) Hoshi, T., Zagotta, W. N. & Aldrich, R. W.: Two Types of inactivation in Shaker K⁺ channels: Effects of alterations in the carboxy-terminal region. *Neuron*, **7**, 547-556 (1991).
- 61) VanDongen, A. M. J., Frech, G. C., Drewe, J. A., Joho, R. H. & Brown, A. M.: Alteration and restoration of K⁺ channel function by deletions at the N- and C-termini. *Neuron*, **5**, 433-443 (1990).
- 62) Luneau, C., Wiedmann, R., Smith, J. S. & Williams, J. B.: Shaw-like rat brain potassium channel cDNA's with divergent 3' ends. *FEBS Lett.*, **288**, 163-167 (1991).

Single Channel Analysis of the Voltage-dependent Potassium Channels, NGK1 and NGK2, Expressed in Mouse Fibroblasts Tetsuro Kawamura, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **101**, 318 - 329 (1992)

Key words voltage-dependent potassium channel, fibroblast, transfection, single channel recording

Abstract

Two types of K^+ channels expressed in NG108-15 cells, mouse neuroblastoma and rat glioma hybrid cells, had been identified by molecular technique. The NGK1 belongs to the Shaker-related subfamily and the NGK2 belongs to the Shaw-related one. The NGK1 and the NGK2 cDNAs were independently transfected to the B82 mouse fibroblast cells. Two types of stably transformed clones, each expressing the NGK1 and the NGK2 gene products, were established. Electrophysiological properties of the NGK1 and the NGK2 were studied using these clones by single channel recording technique. The manner in which the channels opened, was voltage-dependent. The slope conductance of the open channels was found to be 11 pS for the NGK1 channel and 18 pS for the NGK2 channel with the extracellular and pipette solution having a 5.4 mM K^+ concentration at 18-20 °C. The reversal potentials suggested that both of the channels were predominantly K^+ selective. In ion substitution experiments, the reversal potentials of the NGK1 and the NGK2 channels changed linearly by 51 mV and 41 mV, respectively, per decade change in extracellular K^+ concentration. This finding indicates poor K^+ selectivity of the NGK2 channels. The ensemble averages of both channels revealed slow inactivation during a long period of depolarization. Inactivation of the NGK2 channels was more prominent than that of the NGK1 channels. The analysis of open-channel probabilities showed that the NGK2 channels required more depolarization for activation than the NGK1 channels. The probability of the NGK2 channel being open was always lower than that of NGK1 channel. Mean open time-voltage relationships of the NGK1 and the NGK2 channels were voltage-dependent. The manner of the dependence, however, was different in each case. The mean open time of the NGK2 channel was always longer than that of the NGK1 channel in the transmembrane potential range of 10-50 mV. In this study, distinct electrophysiological characteristics were found in the NGK1 and the NGK2 channels.