

Three Distinct Types of K Channels in Bovine Retinal Pigment Epithelium

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/2297/9370

ウシ網膜色素上皮における異なる3種類のKチャンネル

金沢大学医学部医学科眼科学講座 (主任: 河崎一夫教授)

高比良 雅之

網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 細胞のKコンダクタンスを構成するKチャンネルを特定し、それらがどのように制御されているかを解明することを目的として、新鮮単離されたウシRPEのホールセル電流をパッチクランプ法で調べた。ウシRPE細胞の平均静止膜電位は -64mV であった (185例)。ウシRPE細胞には1種類の内向き整流K電流と2種類の外向き整流K電流が存在した。内向き整流K電流は時間非依存性で、細胞外 Cs^+ により選択的に阻害された。このチャンネルのコンダクタンスは細胞外 K^+ 濃度の増加に伴って減少した。この現象はKチャンネルとしては非典型的であるが、RPEが網膜下腔の K^+ 濃度を制御するうえで好都合であると考えられる。内向き整流Kチャンネルの活性を維持するにはピペット内に高濃度 (2~4mM) のATPが必要であった。1番目の外向き整流K電流は膜脱分極の継続により不活性化される遅延型外向き整流K電流であった。このチャンネルは -40mV より陽性の膜電位でのみ開いており、従ってこれが静止Kコンダクタンスとして働いているとは考えられない。遅延型外向き整流K電流は細胞外テトラエチルアンモニウムイオン (tetraethylammonium ion, TEA⁺) により選択的に阻害された。2番目の外向き整流K電流は膜脱分極を継続しても不活性化しない持続型外向き整流K電流であった。これは調べた全細胞の24%においてのみ記録された。このチャンネルの開口閾値電位は約 -90mV であった。高濃度の Ba^{2+} は持続型外向き整流K電流を阻害したが、TEA⁺はこれを阻害しなかった。内向き整流Kチャンネルおよび持続型外向き整流Kチャンネルは静止膜電位付近で開いており、従ってこれらがウシRPEの静止Kコンダクタンスを構成することが判明した。さらにKチャンネル阻害剤に対する感受性の観点から、内向き整流Kチャンネルおよび持続型外向き整流KチャンネルはそれぞれRPEの微絨毛突起側および基底側に存在すると考えられる。

Key words potassium channel, retinal pigment epithelium, patch clamp, whole-cell current, bovine

網膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) は視細胞と脈絡膜との間に位置し、血液・網膜関門としての役割の大部分を担っている。RPEの微絨毛突起は網膜下腔と称される細胞外間隙を介して視細胞外節に面している。RPEの重要な機能の一つは視細胞周囲の細胞外液の成分および容量を調節することである。これはすなわちRPEの微絨毛突起側および基底側に存在するイオン、代謝産物あるいは水の輸送体の働きによる。視細胞周囲におけるイオンの平衡状態の破綻は視細胞機能の障害につながり¹⁾、また網膜下腔における細胞外液の貯留は網膜剥離の原因となり得る²⁾。従って視細胞周囲の微細環境を正常に維持することは視覚にとって非常に重要である。

両生類³⁾、ウシ⁴⁾あるいはヒト⁵⁾のRPE・脈絡膜の組織切片を用いた電気生理学的研究によれば、RPEの微絨毛突起側および基底側には比較的大きなKコンダクタンスが存在する。RPEはこれらのKコンダクタンスを介して K^+ を総量で神経網膜側から脈絡膜側へ輸送する⁶⁾⁸⁾⁹⁾。またこれらのKコンダクタンスはRPEにおける HCO_3^- および Cl^- の輸送の量や方向をも制御する¹⁰⁾¹¹⁾。これらRPEのKコンダクタンスの機能を詳しく理解するためには、それらを構成するKチャンネルを特定し、さらにそれらのチャンネルがどのように制御されているかを知る

必要がある。

RPEのKチャンネルに関しては、まず新鮮単離されたカエルRPE細胞を用いたパッチクランプの実験において、2種類のKチャンネルに由来する電流、すなわち内向き整流K電流および遅延型外向き整流K電流の存在が報告された¹²⁾。これらのうち内向き整流Kチャンネルは生理的膜電位において機能しており、それゆえにRPEの静止Kコンダクタンスを構成するKチャンネルの一候補であることが示唆される。

現在、哺乳類のRPEのKチャンネルに関してはあまり多くは知られていない。霊長類の新鮮単離RPEにおいて外向き整流K電流の存在が近年報告されたが¹³⁾¹⁴⁾、それらの結果には不一致な点がある。すなわちWenら¹³⁾が報告したサルおよびヒトの新鮮単離RPEにおける外向き整流K電流は膜電位依存性、活性化の時間経過および阻害剤に対する感受性などの特性においてカエルRPEの遅延型外向き整流K電流に類似している。しかし筆者ら¹⁴⁾が報告した新鮮ヒトRPEにおける持続型外向き整流K電流は、上記のような特性において遅延型外向き整流K電流とは異なり、むしろ神経細胞におけるM電流¹⁵⁾に類似していた。良好な状態の新鮮ヒトRPE細胞を恒常的に得るのは容易ではなく、また実験に用いたヒトRPE細胞において死後変化の

平成9年10月27日受付、平成10年1月8日受理

Abbreviations: 4-AP, 4-aminopyridine; DMSO, dimethylsulfoxide; E_K , equilibrium potential of potassium; $[\text{K}^+]_o$, extracellular concentration of potassium ion; K_a , dissociation constant; NMDG, N-methyl-D-glutamine; RPE, retinal pigment epithelium; R_s , series resistance; TEA, tetraethylammonium

関与も否定できなかったので、上記の結果の不一致の理由はいまだに解明されていない。哺乳類の培養RPE細胞においてもKチャンネルが発現しているが、それらの性質は新鮮RPEのKチャンネルのそれとは異なっている¹⁶⁾。

本研究では入手が比較的容易で、膜輸送の研究対象⁵⁾⁶⁾¹¹⁾としてもよく用いられるウシRPEに着目した。酵素的に新鮮単離されたRPE細胞においてパッチクランプ法にてホールセル電流を記録し、そのうちKチャンネルに由来する成分を解析した。新鮮分離ウシRPEにおいては3種類のK電流、すなわち内向き整流K電流、遅延型外向き整流K電流および持続型外向き整流K電流が発現していた。

対象および方法

I. 溶 液

細胞外を灌流する標準リング液は以下の組成を有し (135mM NaCl, 5mM KCl, 10mM HEPES, 10mM グルコース,

1.8mM CaCl₂, 1mM MgCl₂), そのpHはNaOHの滴下にて7.4に設定された。K⁺, Cs⁺, Ba²⁺あるいはテトラエチルアンモニウムイオン (tetraethylammonium, TEA⁺) の濃度が異なる細胞外溶液は、それらのCl塩を等モル濃度のNaClと置換することで得られた。4-アミノピリジン (4-aminopyridine, 4-AP) を含む溶液は、NaClとの置換によって得られたが、そのpHを7.4に保つためにHClを滴下する必要があった。キニジンを含む溶液は、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) を溶媒とした高濃度溶解液の適量を標準リング液に加えることで得られた。その際の最終DMSO濃度は0.1% (容量) 以下であった。すべての細胞外溶液の浸透圧は288 ± 5mOsm/lに保たれた。

標準のピペット内充填液は以下の組成を有し (30mM KCl, 100mM K-グルコネート, 5mM HEPES, 10mM エチレングリコールビス (β-アミノエチルエステル)-N,N,N',N'-テトラ酢酸, 0.5mM CaCl₂, 2mM MgCl₂), そのpHはKOHを加えることにより7.2に設定された。ここで遊離Ca²⁺濃度は約2 × 10⁻⁸Mに

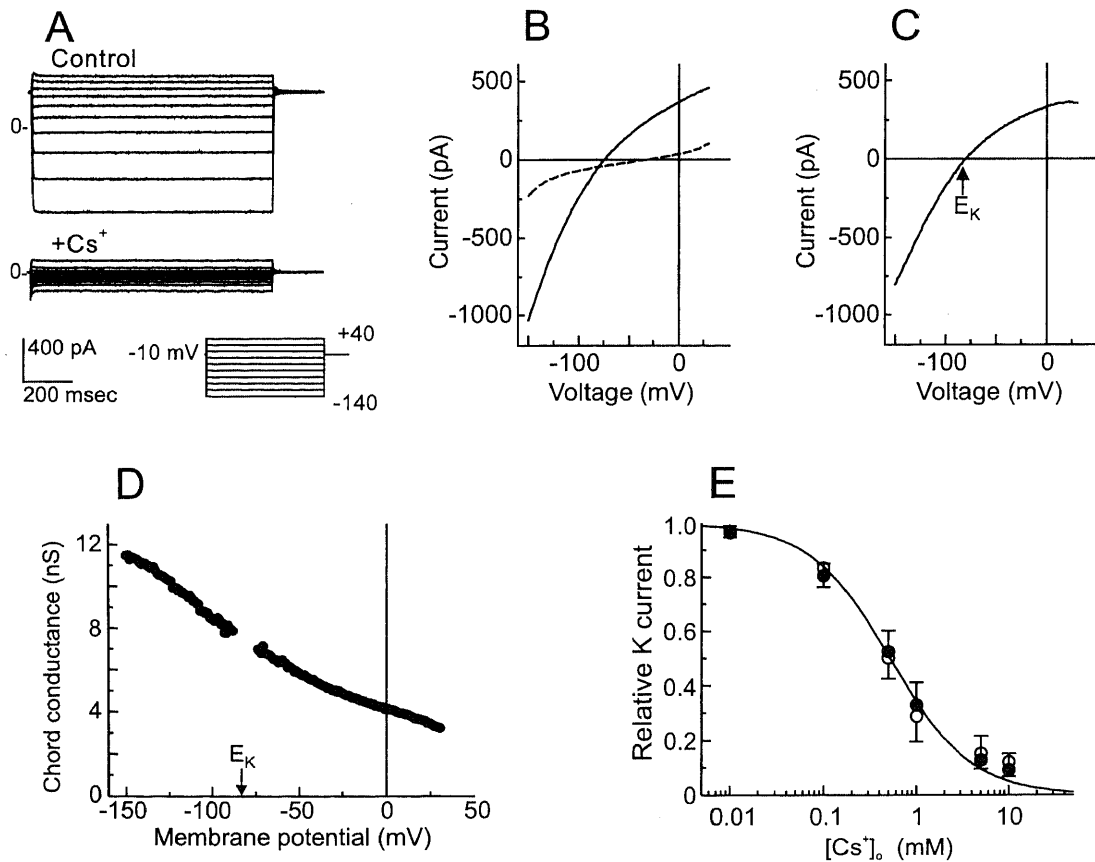


Fig. 1. Isolation and concentration-dependent block by Cs⁺ of the inwardly rectifying K current. (A) Families of whole-cell currents evoked by 1-sec voltage-pulses to potentials ranging from -140 to +40 mV from a holding potential of -10 mV. The cell was initially bathed in the standard Ringer solution with 100 μM Gd³⁺ (upper panel), and then was exposed to 50 mM external Cs⁺ (lower panel). Currents were recorded in the whole-cell-patch configuration with 4 mM ATP in the pipette solution. (B) Steady-state current-voltage (I-V) relationships in the absence (—) and presence (-----) of 50 mM Cs⁺. Currents were generated by 2-sec voltage-ramp from +40 to -160 mV. Currents reversed at -75 mV in the control perfusate and at -31 mV in the presence of Cs⁺. (C) Cs⁺-sensitive current, obtained as the difference between the I-V curves in (B). The difference current reversed at -82 mV, which is close to the equilibrium potential of K⁺ (E_K). (D) Conductance-voltage relationship. Chord conductance was calculated from data in (C), using the equation (1). (E) Concentration-dependence of the Cs⁺-induced block of the inwardly rectifying K current. Amplitudes of the K current obtained by the equation (2) in various extracellular Cs⁺ concentration ([Cs⁺]_o) were normalized to the value in the absence of Cs⁺. Symbols represent \bar{x} (n=5) for measurements when the membrane potentials were -36 mV (●) and -120 mV (○), and the positive and negative error bars indicate SEM at -36 mV and at -120 mV, respectively. Smooth curve is the least-squares fit of the data at -36 mV to the equation (3) with K_d of 0.52 mM.

緩衝された。この溶液の浸透圧は $278 \pm 5 \text{ mOsm/l}$ であった。このピペット内充填液および標準リング液に含有する K^+ 濃度から Nernst の式を用いて計算される理論的な K 平衡電位 (equilibrium potential of potassium, E_K) は -86 mV であった。

本研究の当初においては細胞の容積増加により活性化される Cl 電流が観察されることがあった¹⁷⁾¹⁸⁾。この場合に細胞の静止膜電位は徐々に脱分極する傾向にあったので、この電流が観察された細胞は本研究の対象から除外された。後にこの電流の活性を抑制する目的で、ピペット内充填液の K-グルコネート濃度を 83 mM に減量することによって溶液の浸透圧を $244 \pm 5 \text{ mOsm/l}$ に低下させた (全 185 例中 110 例)。このピペット内溶液と標準リング液との組成から計算される E_K は -83 mV であった。

細胞によっては -100 mV より陰性電位での膜過分極の持続によって大きく律動する内向き電流が観察された。内向き整流

K 電流の特性を調べる際にはこの律動する内向き電流の混入は不都合であるので、これを阻害する目的で細胞外灌流液に $100 \mu\text{M}$ の Gd^{3+} を加えることがあった (Cl 塩)。この濃度の Gd^{3+} は内向き整流 K 電流の膜電位依存性、時間依存性および阻害剤に対する感受性には有意な影響を及ぼさなかった。しかし Gd^{3+} は 2 種類の外向き整流 K 電流の時間依存性を大きく変化させたので、これら 2 種類の電流の解析には Gd^{3+} 存在下での結果を用いなかった。

細胞分離用溶液は以下の組成を有し [135 mM N-メチル-D-グルタミン (N-methyl-D-glutamine, NMDG)-Cl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM グルコース, 3 mM EDTA-KOH, 3 mM システイン, 0.2 mg/ml タイプ III パパイン], その pH は NMDG 塩基の滴下にて 7.4 に設定された。

カリブドトキシン (charibdotxin) (Alamone Labs, Elsarem, Israel) を除く試薬はすべてシグマ (Sigma, St. Louis, USA) か

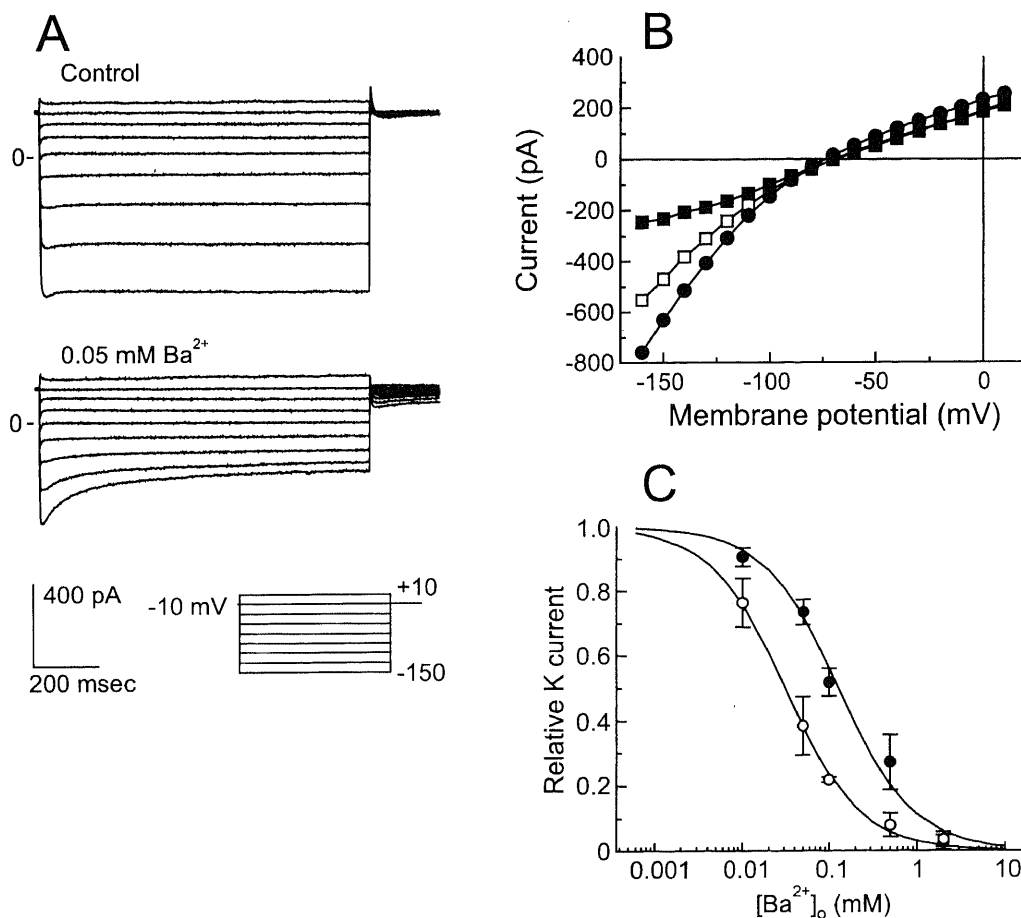


Fig. 2. The effect of external Ba^{2+} on the inwardly rectifying K current. (A) Families of whole-cell currents recorded in the perforated-patch configuration in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of 0.05 mM external Ba^{2+} . The membrane potential was held at -10 mV and then clamped to potentials ranging from -150 to $+10 \text{ mV}$ in 20 mV increments. The control perfusate contained 0.1 mM Gd^{3+} . In the presence of 0.05 mM Ba^{2+} , inward currents evoked by large hyperpolarizing voltage-pulses decayed with an exponential time course, consistent with a voltage-dependent block. (B) Effects of Ba^{2+} on I-V relationship of the whole-cell current. Steady-state currents in the absence of Ba^{2+} (●) (average values of the currents in the upper panel of (A) between 900 and 1000 msec) and instantaneous (□) and steady-state (■) currents in the presence of 0.05 mM Ba^{2+} (current values in the lower panel of (A) at 10 msec and at 996 msec, respectively). (C) Concentration- and voltage-dependence of the Ba^{2+} -induced block of the inward rectifier. Amplitudes of the K current obtained by the equation (2) in various extracellular Ba^{2+} concentration ($[\text{Ba}^{2+}]_o$) were normalized to the value in the absence of Ba^{2+} . Symbols represent \bar{x} for measurements at -36 mV (●) and -120 mV (○) ($n=3$ to 6). Error bars indicate SEM. The continuous curve was the least-squares fit of the data measured at the two voltages to the equation (3), with K_a values of $128 \mu\text{M}$ at -36 mV and $31 \mu\text{M}$ at -120 mV .

ら購入された。

II. 細胞の分離

ウシの眼球は食肉加工場において屠殺直後に摘出された。その場で直ちに眼球を赤道部に割半し、周囲を氷で冷却した容器内の標準リングル液にその眼球後極側を浸し、1時間以内に研究室に運んだ。研究室において、その眼球後極部側の硝子体を除去し、神経網膜を丁寧に剥離・除去した。ついで視神経乳頭より下方の色素に富む領域より、数mm四方のRPE・脈絡膜組織片を切り出した。この組織片を試験管内のパパインを含有する細胞分離用溶液(上記)に室温にて10分間浸し、ついで0.1%のウシ血清アルブミンを含有する標準リングル液に3分間浸してパパインの反応を停止させた。さらに組織片を標準リングル液に10分間浸した後に試験管ごと軽く攪拌し、その溶液の一部を顕微鏡下で観察した。RPE細胞が単離されるまで、この一連の分離作業を反復した。ただし2回目以降のパパインの作

用時間はすべて5分間とした。細胞の単離にはパパインの作用時間にして通常20~30分を要した。試験管内の2~3mlの標準リングル液内に浮遊あるいは沈殿した単離RPE細胞を実験に用いるまで4℃にて保存した。

III. 細胞の設置・灌流

細胞灌流用のチェンバーは倒立位相差顕微鏡ダイアフォト(ニコン、東京)の鏡台に設置・固定できるように研究室にて作成された。チェンバー外壁には透明のアクリル、底部にはスライドガラスが用いられ、その内容積は約2mlであった。まず約0.5mlの単離RPE細胞が浮遊する溶液(上記)をチェンバー内にパスツールピペットにて滴下した。多くの細胞が沈殿してスライドガラスに接着するまで10~20分を経た後、標準リングル液の灌流を開始した。灌流液は60ml注射シリンジ外套からポリプロピレンおよびシリコン製のチューブを用いて自然落下で毎分3mlの流速にてチェンバーまで導かれた。チェンバー内

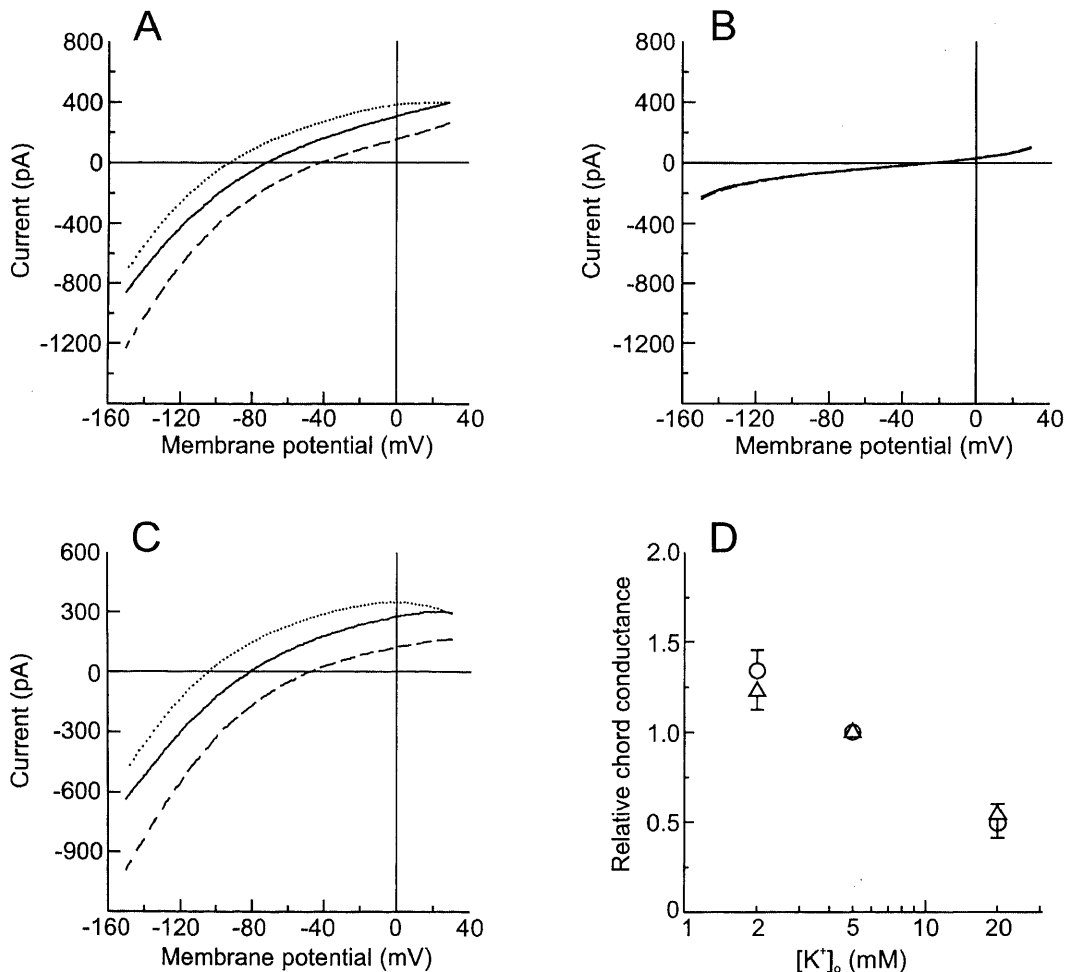


Fig. 3. Relationship between the inwardly rectifying K channel and extracellular K^+ concentration ($[K^+]_o$). (A) I-V relationships obtained in a single cell when $[K^+]_o$ was 2 mM (.....), 5 mM (—) and 20 mM (----). The whole-cell-patch configuration was applied with 4 mM ATP in the pipette solution. All external solutions contained 0.1 mM Gd^{3+} . Currents were generated by 2-sec voltage-ramp from +40 to -160 mV. (B) I-V curves obtained from the same cell in the presence of 50 mM external Cs^+ with 2 mM (.....), 5 mM (—) and 20 mM (----) K^+ . All three traces are superimposed on one another. (C) Cs^+ -sensitive currents. The I-V relationship of the inward rectifier in each $[K^+]_o$ was isolated by taking the difference between I-V curves measured in the absence (A) and presence (B) of Cs^+ . (D) Relationship between the channel conductance and $[K^+]_o$. In each cell, the inward and outward chord conductances of the inward rectifier were measured at $E_K \pm 25$ mV in 2, 5 and 20 mM $[K^+]_o$, and were then normalized to the values observed in 5 mM $[K^+]_o$. The symbols represent \bar{x} of the relative inward (Δ) and outward (\circ) conductances ($n=5$). The negative and positive error bars indicate SD of the relative inward and outward conductances, respectively.

の灌流液容積が常に約0.5mlに保たれるように吸引用注射針からチューブを通して吸引・排液された。チャンバー内の灌流液の交換はチューブの途中に設置した灌流スイッチを用いて60秒以内に行われた。

IV. バッチピペット

バッチ用ピペットには外径1.5mm内径1.2mmの7052ガラス微小管 (Garner Glass, Claremont, USA) を用い、プログラム式水平型ピペットプラー (Sutter Instruments, San Rafael, USA) にてピペット先端部を作製した。ピペット先端部の浮遊容量を減らす目的で、ピペットの彎曲部付近からできる限り先端開口部近くにまでシルガード® (Sylgard®) (Daw Corning, Midland, USA) を塗布し、ついで加熱によってこれを凝固させた。さらに細胞膜をパッチする直前に、ピペット先端部をマイクロフォージ (成重, 東京) にて加熱形成した。その際のピペット先端開口部の大きさは、10ml注射シリンジに装着したピペットの先端をエタノール中に浸し、シリンジ内の10mlの

空気を内筒にて加圧した際にピペット先端から発砲し始めるときの空気の容量が6.2~7.0mlとなるように調整した¹⁹⁾。これは電極内に塩化カリウムを充填した場合のピペット抵抗値 (pipette input resistance) で4~5M Ω に相当した。

細胞膜全体のイオンチャンネルに由来する電流、すなわちホールセル電流を記録するバッチクランプの手法としては下記のように穿孔パッチ (perforated-patch) 法あるいはホールセルパッチ (whole-cell-patch) 法を用いた。穿孔パッチ法ではピペット内液に含有したナスタシン (nystacin) あるいはアンホテリシンB (amphotericin B) の作用によりパッチ膜にチャンネル孔が形成されることによってホールセル記録が確立される²⁰⁾。このチャンネル孔を透過する溶質は1価のイオン (Na^+ , K^+ および Cl^-) に限られ、他の細胞内のイオンや代謝産物はピペット内に拡散しない。従って本法では細胞の恒常性が保たれるため比較的長時間 (1時間以上) の電流記録が可能である。本研究での穿孔パッチ法 (68例) にはすべてアンホテリシンBを用いた。

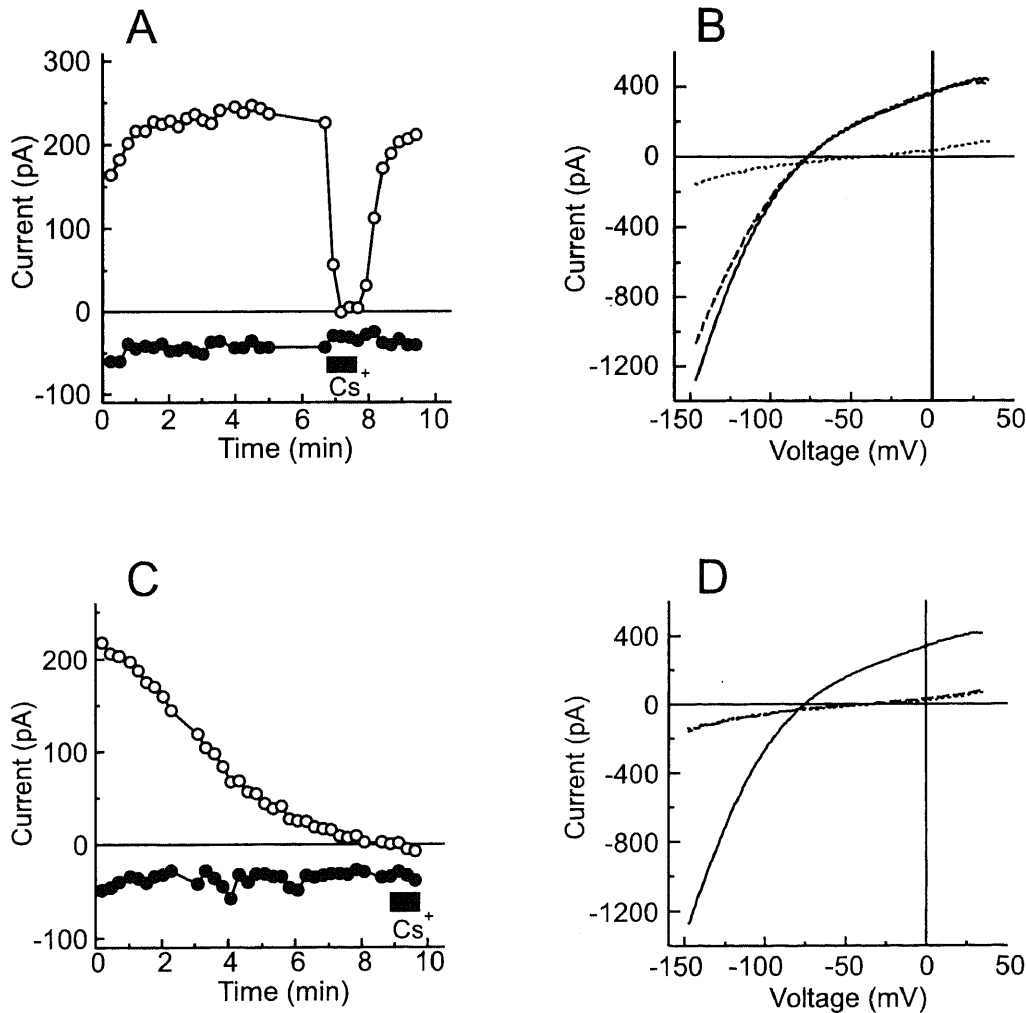


Fig. 4. ATP-dependence of the inwardly rectifying K current. (A) Time course of changes in current during internal dialysis with the pipette solution containing 2 mM ATP. The cell was bathed in the standard Ringer solution without Gd^{3+} . Symbols depict currents measured at -36 mV (\circ) and at -83 mV (\bullet), which represent the inwardly rectifying K current and the residual currents, respectively. The box indicates exposure of the cell to 20 mM external Cs^+ . (B) I-V curves obtained in the same cell as in (A) at 60 sec (—), 6.5 min (----) and during exposure to external Cs^+ at 7 min (.....). (C) An identical experiment in another cell dialyzed with ATP-free pipette solution. The current at -36 mV decreased to zero within 8 min and thereafter was unaffected by 20 mM external Cs^+ , indicating complete "run-down" of the inward rectifier. (D) I-V curves obtained from the same cell in (C) at 30 sec (—), 8.5 min (----) and during exposure to 20 mM external Cs^+ at 9.5 min (.....).

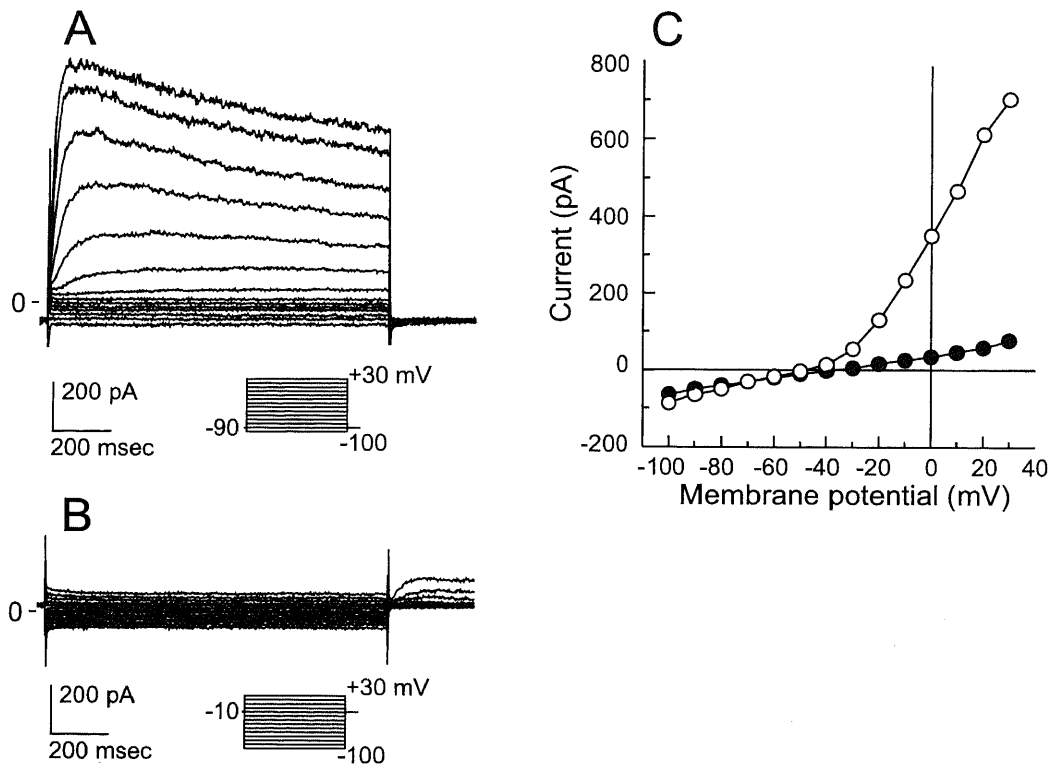


Fig. 5. The delayed outwardly rectifying K current and its dependence on the holding potential. (A) Currents were elicited from a holding potential of -90 mV by a series of voltage-pulses to potentials ranging from -100 to $+30$ mV in 10 -mV increments. Voltage-steps were applied at 10 -sec intervals. Currents were recorded in the whole-cell-patch configuration with ATP-free pipette solution. (B) Currents evoked in the same cell by the voltage-steps from a holding potential of -10 mV to the same potentials as in (A). (C) I-V relationships obtained at holding potentials of -90 mV (○) and -10 mV (●), using the data in (A) and (B). Data points represent peak amplitudes of the outward currents, if any. Otherwise, they represent average amplitudes of currents measured between 1150 and 1200 msec.

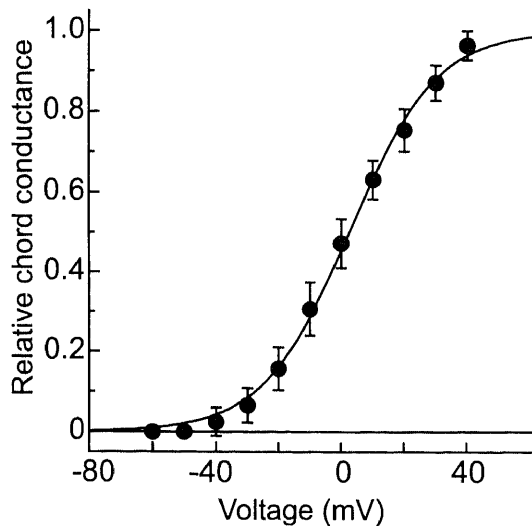


Fig. 6. Voltage-dependence of the delayed outwardly rectifying K current. Conductance-voltage relationship was measured in the standard Ringer solution. Chord conductance at each membrane potential was calculated from leak-subtracted peak currents according to the equation (1). In each cell, the chord conductance was normalized to the maximum value, which was obtained by fitting the data to a Boltzmann function given by the equation (4). Symbols and vertical bars represent $\bar{x} \pm SD$ for 13 cells. The smooth curve is the least-squares fit of the data points to the equation (4) with the values of $V_{1/2} = +2.5$ mV and $k_n = -13.7$ mV. All cells were recorded in the whole-cell-patch configuration with ATP-free pipette solution.

アンホテリシンBをまずDMSOに溶解し、その適量を標準ピペット内液にて希釈し (DMSO濃度は0.4%), 最終のアンホテリシンB濃度, $200 \mu\text{g/ml}$ を得た。このアンホテリシンB含有ピペット内充填液は冷蔵庫内 (4°C , 暗所) に保存され、作成してから1時間以内に使用された。アンホテリシンB分子が細胞膜に触れるとギガオームシール (下記) の形成が困難である。従ってまず先端開口部からアンホテリシンBを含まない標準ピペット内液を液コラムの長さにして $200 \sim 300 \mu\text{m}$ 吸引し、ついでアンホテリシンB含有ピペット内液をピペット後端から充填した。一方ホールセルパッチ法はギガオームシール (下記) を形成した後、吸引あるいは通電にてパッチ膜を破くことによってホールセル記録を確立する方法である。この場合にはピペット内充填液が細胞内に拡散するため、細胞内組成の変化によってイオンチャンネルが不活性化することがある。しかし逆に細胞内成分を自由に設定できるという利点がある。本研究でのホールセルパッチ法 (117例) においては、目的に応じて標準ピペット内充填液に $2 \sim 4\text{mM}$ のATP (Mg塩) を加えることがあった。ホールセルパッチ法ではピペット内には先端と後端の両側から同じ組成の溶液を充填した。

すべてのピペット内充填液は予めシリンジフィルター (孔径 $0.2 \mu\text{m}$) により濾過された。

V. ホールセル電流の記録

パッチピペットの電位はパッチクランプ用アンプ、アクソパッチ® (Axopatch®) (Axon Instruments, Foster City, USA) を介してコンピューター (486型CPU) のソフトウェア、ピークラ

ンプ® (pClamp®) (Axon Instruments) にて制御された。この電位固定時にピペットに流れる電流は同アンプにて増幅され、オシロスコープにて観察された。不関電極としては銀・塩化銀電極-寒天ブリッジ (4%寒天・150mM KCl溶液) を用いた。

パッチピペットを内液充填の後直ちにピペットホルダーに装着し、ピペット先端をチャンバーの灌流液に浸した。これ以降ホールセル記録の状態を確立するまで、電圧+10mVの矩形波刺激によって惹起される電流 (シールテスト電流) をオシロスコープで観察した。まずその基線をゼロに補正し、シールテスト電流が矩形波状となることを確認した。ついで顕微鏡下でマイクロマニピュレーター (Newport, Irvine, USA) を操作して、ピペット先端を目的とするRPE細胞の基底側の細胞膜に接触させた。さらにシールテスト電流の振幅から計算されるピペット・細胞膜間の抵抗が十分に大きくなるまで (通常10GΩ以上)

上), すなわちギガオームシールが得られるまで、ピペット内に徐々に陰圧をかけ細胞膜を吸着させた。

その後ホールセル記録の状態を確立する方法は以下の2通りであった。まず穿孔パッチ法では、アンホテリシンB的作用によりパッチ膜の透過性が十分に大きくなるまで、すなわちピペットおよびパッチ膜に由来する抵抗 (series resistance, R_s) が徐々に減少して30MΩ以下になるまで、通常10~20分間待機した。一方ホールセルパッチ法では、さらにピペット内に大きな陰圧をかけてパッチ膜を破碎した。これは矩形波状のシールテスト電流が急峻なピークを有する波形に突然に変化することによって確認された。

R_s は膜電位ステップにより惹起される膜容量依存性電流の振幅から計算された²¹⁾。ホールセル電流記録時の R_s は穿孔パッチ法では $23 \pm 8\text{M}\Omega$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, 68例), ホールセルパッチ法では

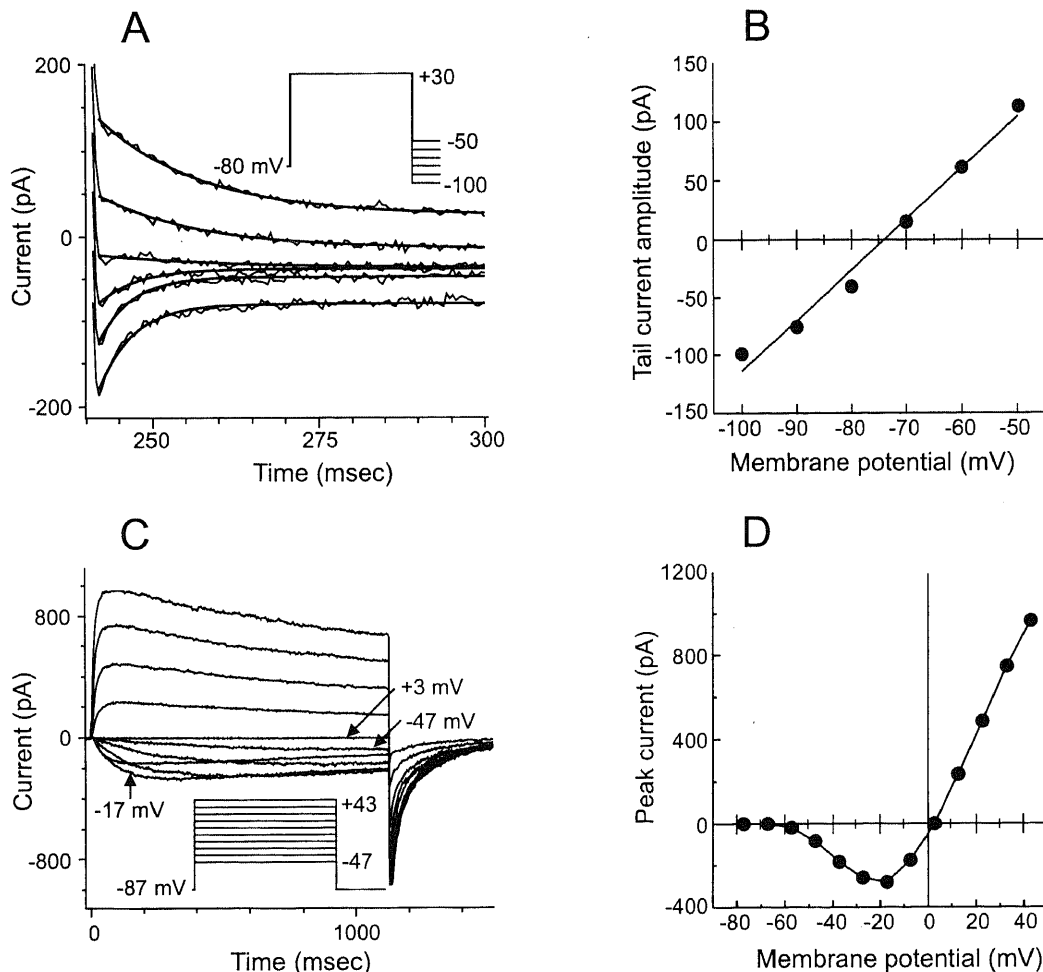


Fig. 7. Ion-selectivity of the delayed outwardly rectifying K current. (A) Tail currents recorded from a cell bathed in the standard Ringer solution ($5\text{ mM } [\text{K}^+]_o$). The whole-cell-patch configuration was applied with ATP-free pipette solution. The membrane voltage was first depolarized for 240 msec to a holding potential of -80 mV to $+30\text{ mV}$ to maximally activate the conductance (not shown), and then was hyperpolarized to potentials ranging from -100 to -50 mV , which deactivated the conductance to produce tail currents. The membrane potential was held at -80 mV for 10 sec between test pulses. The noisy traces depict the tail currents and the smooth traces represent exponential fits of the data points. The traces were low-pass filtered at 5 kHz . (B) Amplitudes of the tail currents determined by exponential fits of the current relaxations in (A) plotted as a function of the test potential. The straight line is the best fit of the data points by linear regression. The cross-point between the x-axis at zero current and the regression line indicates a reversal potential of -74 mV . (C) Currents recorded from another cell in $140\text{ mM } [\text{K}^+]_o$. The whole-cell-patch configuration was applied with ATP-free pipette solution. The membrane voltage was stepped from a holding potential of -87 mV to various test potentials in 10-mV increments. (D) Peak currents from (C) plotted as a function of voltage.

$11 \pm 4 \text{ M}\Omega$ ($\bar{x} \pm \text{SD}$, 117例)であった。

膜容量依存性電流はアンプ内蔵回路によって相殺された。 R_s が $20 \text{ M}\Omega$ を超える場合にはアンプ内蔵回路によってその50~80%が補正された。またアンプのローパスフィルターは通常 1 kHz に設定された(以下でフィルターの設定値が異なる場合にはその旨を記載した)。これらの修飾の後にシグナルはデジタル化され、後の解析に用いるためにコンピューターのディスク内に保存された。

膜電位固定のプロトコルは大きく分けて以下の3種類であった。その1は、保持電位を静置膜電位付近(通常は -60 mV)に設定し、そこから持続時間120ミリ秒の 10 mV 陽性の矩形波刺激を与えるプロトコルであった。これにより惹起される膜容量依存性電流から細胞膜容量(membrane capacitance)

および R_s を計算し、これらが実験を通してほぼ一定であることを確認した。その2は、膜電位を保持電位からある刺激電位に矩形波様に変化させるプロトコルであった。刺激電位はある範囲内で(例えば $-140 \sim +40 \text{ mV}$) 10 mV あるいは 20 mV 毎に変化させて、5~30秒間隔にて反復させた。これら異なる刺激電位により惹起されるそれぞれの電流は、通常は刺激開始時にそろえて重ねあわせて描出された(例えば図1Aを参照)。その3は、刺激電位のある範囲内で傾斜状に持続的に変化させるプロトコルであった。このプロトコルは持続的な電流・電圧曲線を得るのに有用であるが、それは時間依存性の電流成分が不活性化している条件下に限られる。本研究では、時間非依存性である内向き整流K電流の電流・電圧関係を調べる目的に限り、保持電位を -10 mV とし刺激電位を $+40 \text{ mV}$ から -160 mV

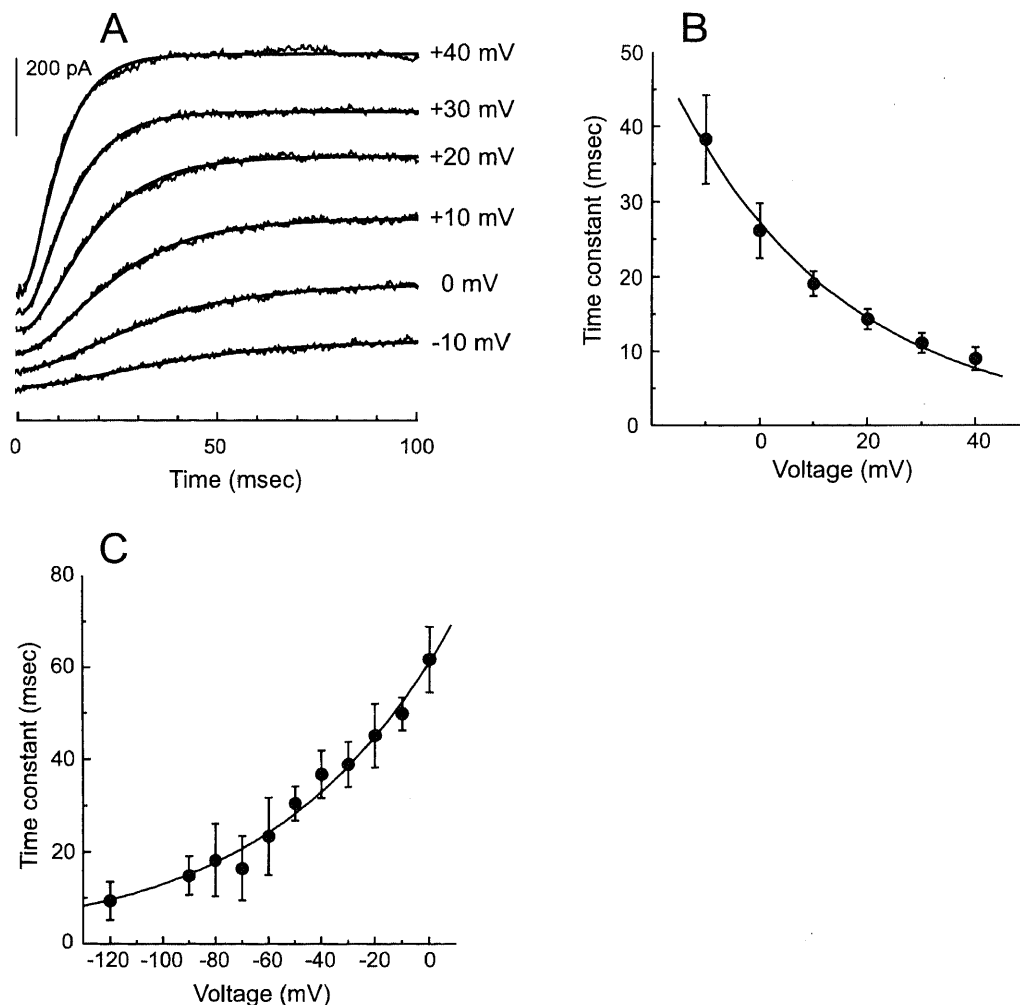


Fig. 8. Activation- and deactivation-kinetics of the delayed outwardly rectifying K current. (A) Time course of activation. The noisy traces are the averages of two separate sets of currents generated by a series of voltage-pulses to the potentials indicated. The membrane potential was held at -70 mV for 8 sec between voltage-pulses. The traces were low-pass filtered at 2 kHz and corrected for residual capacitive artifacts by subtracting the scaled sub-threshold currents. The smooth curves represent the least-squares fit of the data to a Hodgkin-Huxley n^2 model given by the equation (5). The cell was bathed in the standard Ringer solution. The whole-cell-patch configuration was used with ATP-free pipette solution. (B) Voltage-dependence of the activation time constant. Each symbol and error bar represents $\bar{x} \pm \text{SD}$ for 6 cells. For each cell, the activation time constant was determined as shown in (A). The curve is an exponential fit of the data points, indicating that the activation time constant decreased e-fold in 31.7 mV . (C) Time course of deactivation. Deactivating currents at various membrane potentials were fitted as shown in Fig. 7A to obtain time constants for deactivation. Each symbol and error bar represents $\bar{x} \pm \text{SD}$ for 4 to 6 cells. The curve is an exponential fit of the data points, showing that the time constant increased e-fold in 64.8 mV .

まで2秒間で傾斜状に変化させるプロトコルを用いた。持続的な電流・電圧関係を得る際にはそれぞれの記録における R_s による電圧降下を補正した。以上の他、不活性化の緩やかな時間経過を調べる際には、DeCousey²²⁾によるエンベロープ試験

(envelope test)を用いた(図9C参照)。

すべての実験は室温(23~25°C)の下で行われた。

VI. 電流波形および測定値の解析

ピペット先端および寒天ブリッジにおける液相間電位を飽和

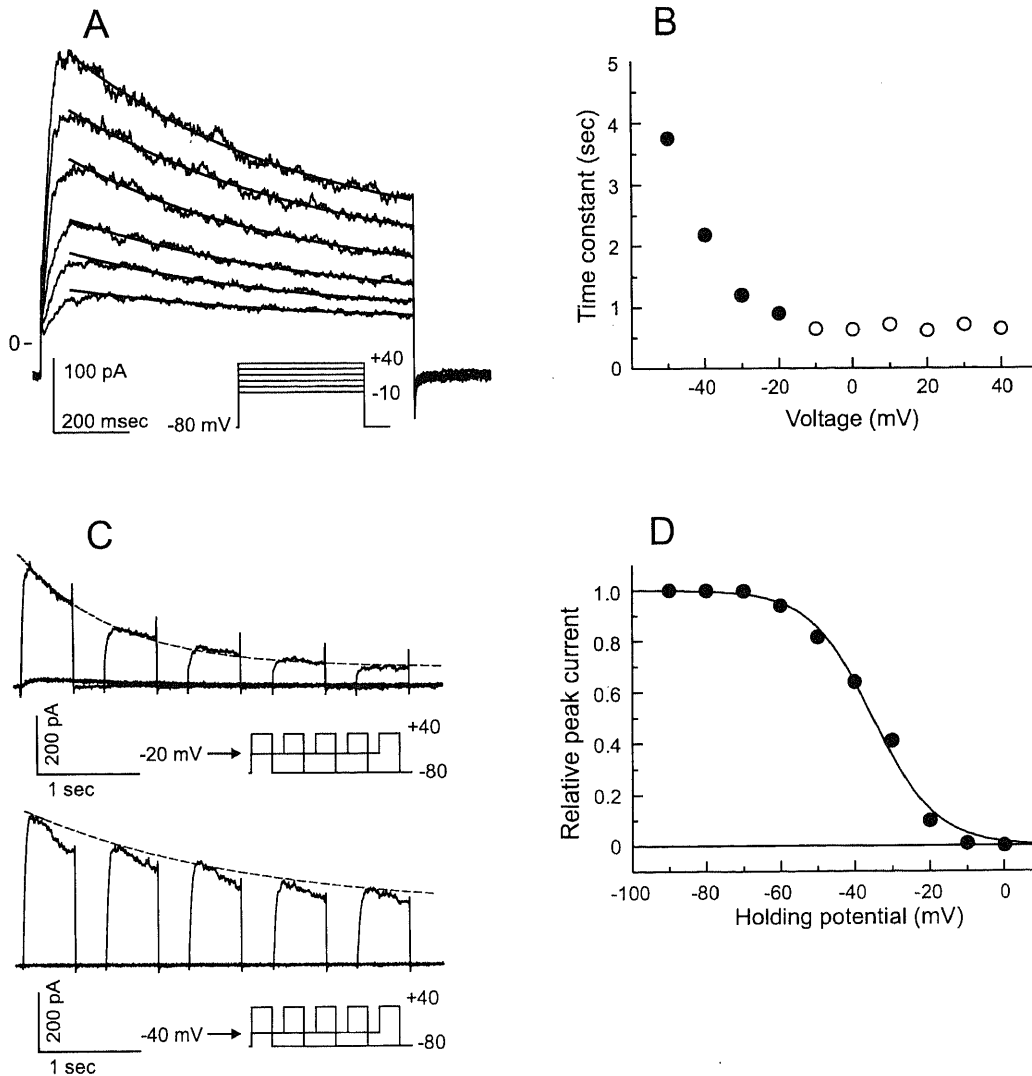


Fig. 9. Inactivation of the delayed outwardly rectifying K current. (A) Time course of inactivation. The noisy traces represent currents evoked by 1-sec membrane depolarizations to potentials ranging from -10 to $+40$ mV. The superimposed smooth traces are exponential fits of the decay in currents. The membrane was held at -80 mV for 15 sec between voltage-pulses to allow time for recovery from inactivation. The cell was bathed in the standard Ringer solution. The whole-cell-patch configuration was applied with ATP-free pipette solution. (B) Voltage-dependence of the inactivation time constant. The open circle represents the time constant determined from the fitting curves in (A). The closed circle represents the time constant obtained by the envelope method as shown in (C). (C) Estimation of the inactivation time course by the envelope test in the same cell as in (A). The upper panel shows a family of currents activated by 500-msec voltage-pulses to $+40$ mV following prepulses to -20 mV of varying duration. Leak currents were not subtracted. The first current, which had no prepulse before it, rose to a peak and then was inactivated partially. The second current, which followed a 750-msec prepulse to -20 mV, rose to a smaller peak, indicating that a substantial fraction of the channels was already inactivated. Peak currents became progressively smaller with longer prepulses. Between each trial, the membrane voltage was held at -80 mV for 30 sec to allow the delayed rectifier channel to recover from inactivation. The interrupted line is an exponential curve with a time constant of 900 msec. The lower panel shows currents produced in the same cell by an identical voltage-clamp protocol as shown in the upper panel except that prepulses were to -40 mV. The interrupted line is an exponential curve with a time constant of 2182 msec. (D) A representative example of the steady-state inactivation. Peaks of the delayed rectifier evoked by test pulses to $+40$ mV from various holding potentials were measured. Before eliciting the test pulse to $+40$ mV, the membrane was held at -90 mV for 30 sec and then at each test holding potential for 30 sec. Data were normalized to the maximum peak current, which was obtained when the test holding potential was -90 mV. The smooth curve is the least-squares fit of the data points to the equation (6) with values of $V_{1/2} = -35.1$ mV and $k_n = 8.5$ mV. The perforated-patch configuration was used. The inward rectifier was blocked by exposing the cell to 20 mM external Cs^+ .

KClブリッジを用いて実測した。電流波形の描出・解析にあたり、その値によって膜電位を補正した(標準液使用時で10mV)。

測定値の理論式への近似には、膜電位を制御するソフトウェア(上記)に付随の解析ソフトウェア、あるいは波形解析用ソフトウェアであるシグマプロット®(Sigma Plot®)(Jandel Scientific Software, San Rafael, USA)を用いた。

統計的解析値を特記しない限り $\bar{x} \pm SD$ の形式にて記載した。

Ⅶ. チャンネルの不活性化と非活性化

膜電位依存性に開口するチャンネルは閉じた状態(closed state)、開いた状態(open state)あるいは不活性化状態(inactivated state)のいずれかの状態にある。本報では不活性化状態に至る過程を不活性化(inactivation)、また閉じた状態に至る過程を非活性化(deactivation)と記載し、これらを区別した²³⁾。

成 績

Ⅰ. 細胞膜の電気生理的パラメーター

新鮮単離されたウシRPE細胞は雪だるま型の形態を呈し、その微絨毛突起側と基底側は閉鎖帯(tight junction)に相当すると考えられるくびれで区切られていた。微絨毛突起側半球は径5~10 μm で、黒色の色素に富み、多数の突起を有した。一方基底側半球は径15~30 μm で、表面の滑らかな細胞膜を有した。ギガオームシールは全例で基底側の細胞膜にて行われた。パッチの標的としては、基底側の細胞膜が明るく滑らかで、微絨毛突起が長くかつ多く、容積の小さい細胞を選んだ。膜容量依存性電流から計算されるウシRPE細胞の細胞膜容量は $82 \pm 22\text{pF}$ (185例)であった。

各細胞でホールセル電流の記録を開始する際に、電流をゼロに固定したときの膜電位すなわち静止膜電位を測定した。標準

リング液灌流下でのウシRPE細胞の静止膜電位は、穿孔パッチ法において $-63 \pm 8\text{mV}$ (68例)、ホールセルパッチ法において $-64 \pm 12\text{mV}$ (117例)であった。

Ⅱ. ホールセル電流

新鮮単離ウシPRE細胞において3種類の異なるK電流が発現していることが下記のように確認された。すなわちそれらは、内向き整流K電流(inwardly rectifying K current)、遅延型外向き整流K電流(delayed outwardly rectifying K current)および持続型外向き整流K電流(sustained outwardly rectifying K current)であった。これらK電流は、各々の膜電位依存性、阻害剤に対する反応、ATP依存性、発現頻度などの特性を利用して下記のように分離され解析された。

記録したほとんどの新鮮ウシRPE細胞では、上記3種類のK電流以外に優位なイオン電流は観察されなかった。すべてのK電流が不活性化された記録条件では、残余電流の電流・電圧曲線は傾きが小さい直線状となり、その際の静止膜電位は -30mV 付近であった(図1A, 1Bを参照)。この残余電流は主にCl電流あるいは非選択的陽イオン電流あるいはその両者によって構成されたと考えられる。

以下では3種類のK電流それぞれの膜電位依存性、時間依存性、Kチャンネル阻害剤に対する特性などの解析結果をK電流の種類別に記載する。

Ⅲ. 内向き整流K電流

1. 内向き整流K電流の分離およびその膜電位依存性

内向き整流K電流は、記録したすべて(185例)の新鮮単離ウシRPE細胞において発現していた。内向き整流K電流を調べる際には、膜電位を -10mV あるいはそれより陽性側電位に保持することによって遅延型外向き整流K電流を完全に不活性化させた(Ⅳ項参照)。持続型外向き整流K電流が発現している細胞

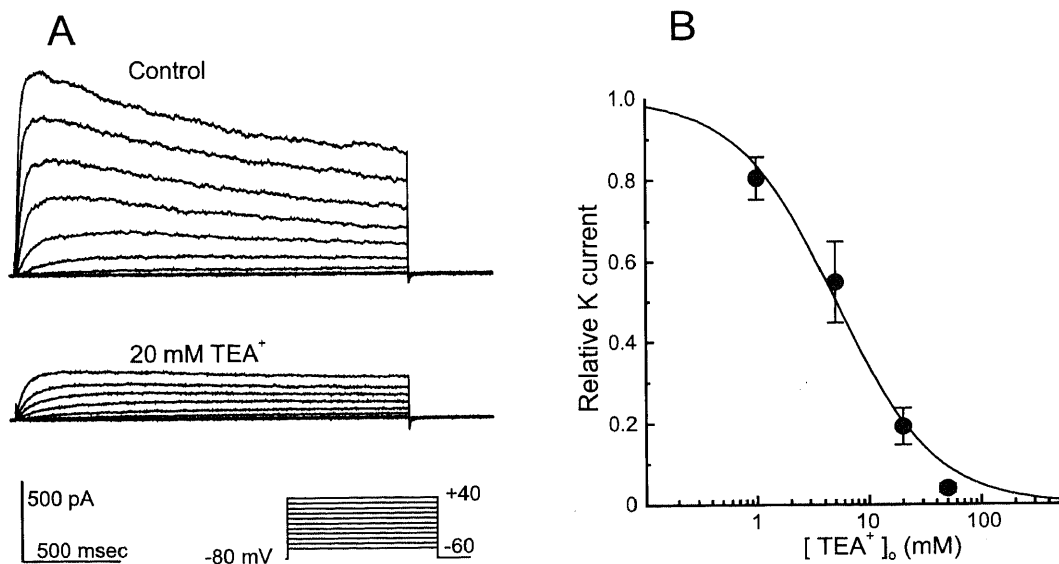


Fig. 10. Sensitivity of the delayed outwardly rectifying K current to external TEA^+ . (A) Families of currents recorded in the same cell in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of 20 mM external TEA^+ . The perforated-patch configuration was applied. The control perfusate contained 20 mM Cs^+ to block the inward rectifier. Leak currents were subtracted. (B) Relationship between the current amplitude and extracellular concentration of TEA^+ ($[\text{TEA}^+]_o$). In each cell, peak currents were evoked by voltage-steps to 0 mV from a holding potential of -80mV at various $[\text{TEA}^+]_o$, and then were normalized to the current measured in the absence of TEA^+ . Each symbol and error bar represents $\bar{x} \pm \text{SD}$ for 4 cells. The curve is the least-squares fit of the data points to the equation (3) with K_d of 5.1 mM.

(全体の約24%, V項参照)は,以下の内向き整流K電流の解析の対象から除外された。

図1A上の波形は標準リンゲル液の灌流下で膜電位を -10mV に保持し -140 から $+40\text{mV}$ の範囲で1.2秒の電位ステップを与えたときに導出されたウシRPEのホールセル電流である。20mV毎の電位ステップ変化により惹起される電流は膜過分極側で内向き(図では下向き)により大きくなった。すなわち内向き整流型のイオンチャンネルに由来する電流がホールセル電流の優位を占めることが示唆される。電流は電位刺激とともに速やかに(10ミリ秒未満)あるレベルにまで変化し,その後は時間依存性がなく平坦であった。同一の細胞で傾斜状電位刺激によって得られた電流・電圧関係を図1Bに示した。

次にKチャンネル阻害剤の一つ, Cs^+ に感受性を示す電流成分について検討した。図1A上と同一の細胞において50mMの細胞外 Cs^+ の存在下で同じ電圧固定プロトコルによって惹起されたホールセル電流を図1A下に, またそのときの電流・電圧関係を図1Bに示した。 Cs^+ により内向きおよび外向きの電流は著しく減弱し,あとには振幅の小さな電流が残った。その残存電流の電流・電圧関係は約 -100mV から 0mV の範囲では直線状であった。標準リンゲル液灌流下で -75mV であった静止

膜電位は Cs^+ の灌流によって -31mV にまで脱分極した(図1B)。他のウシRPE細胞においても細胞外 Cs^+ によるホールセル電流の変化は同様であった。すなわち細胞外 K^+ 濃度(extracellular concentration of potassium ion, $[\text{K}^+]_o$)が 5mM の条件において, Cs^+ の細胞外投与($10\sim 50\text{mM}$)によって静止膜電位は $-68\pm 6\text{mV}$ から $-40\pm 5\text{mV}$ にまで脱分極した(18例)。細胞外 Cs^+ 存在下の静止膜電位が理論的 Cl 平衡電位である -36mV に近いことから, 残存電流の主な成分は Cl 電流であると考えられる。

図1Cの電流・電圧曲線は Cs^+ 灌流前後における2つの電流・電圧曲線(図1B)の差を描出したものであり, すなわち分離された Cs^+ 感受性の内向き整流成分の電流・電圧関係を示した。この逆転電位(reversal potential)は -82mV であり, E_K (-83mV)に極めて近いことから, この電流はそのほとんどが K^+ によって担われていると考えられる。逆転電位より陽性側の電位における外向き電流の抑制が著しくないことは, このチャンネルの内向き整流作用が弱いことを意味する。この電流・電圧曲線から以下の式によって各膜電位におけるチャンネルのイオン透過性すなわちコードコンダクタンス(chord conductance)を計算し, 図1Dに示した。

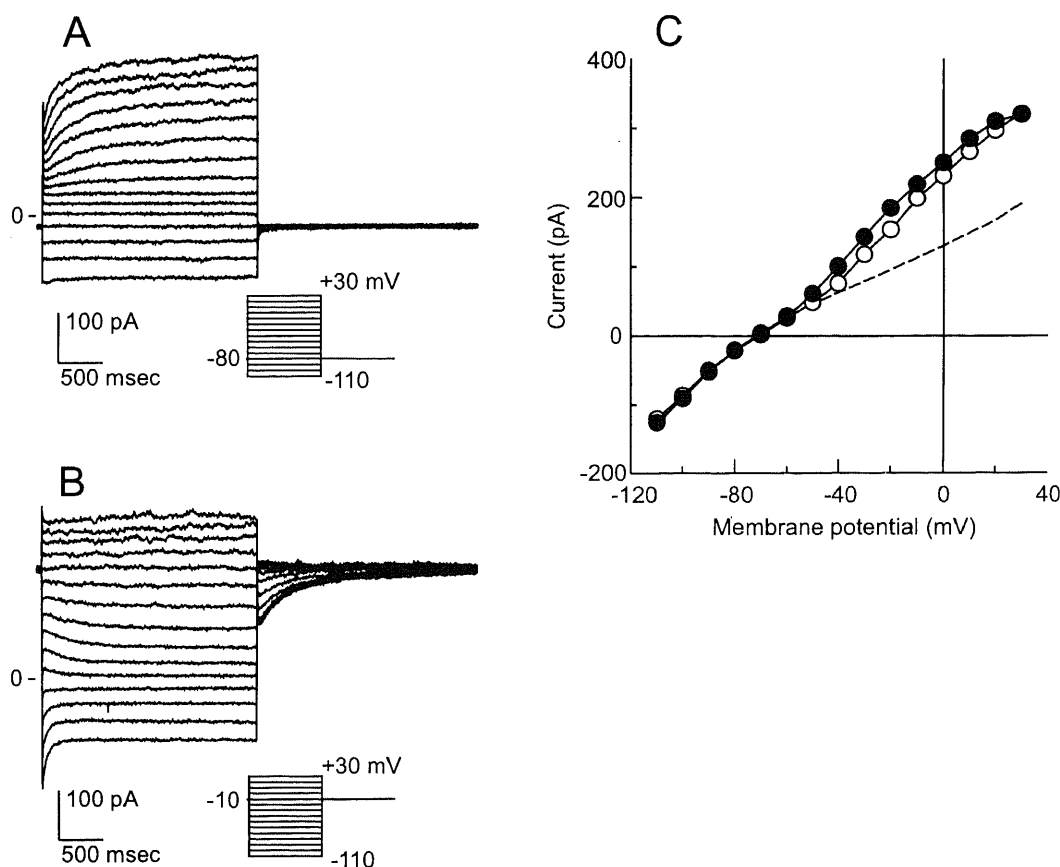


Fig. 11. Sustained outwardly rectifying K current and its independence on the holding potential. (A) A family of currents evoked from a holding potential of -80mV by 2.4-sec voltage-pulses to potentials ranging from -110 to $+30\text{mV}$. The perforated-patch configuration was applied. The perfusate contained 50mM TEA^+ to block the delayed rectifier. (B) Currents evoked in the same cell from a holding potential of -10mV by the voltage-steps to the same potentials as in (A). (C) Steady-state I-V relationships obtained with holding potentials of -80mV (\circ) and -10mV (\bullet). Data points represent the average values of the currents in (A) and (B) measured between 2.2 and 2.4 sec. The interrupted line represents the instantaneous current measured 10 msec after the onset of the voltage-pulses from the holding potential of -80mV in (A).

$$g = \frac{I}{(V_m - V_r)} \quad \dots \dots \dots \text{式1}$$

ここで、 g はコードコンダクタンス、 I はチャンネル由来の電流、 V_m は膜電位、 V_r はチャンネルの逆転電位をあらわす。 $(V_m - V_r)$ はチャンネルの駆動電圧 (driving force) を意味する。コードコンダクタンスは膜電位の脱分極とともに漸減したが、調べた膜電位の範囲では (+40mVまで) ゼロとなることはなかった。すなわちこのチャンネルは弱い内向き整流を有し、どの膜電位においても閉じることがないと考えられる。内向き整流作用を量的に評価するため、内向きおよび外向きのコードコンダクタンスを測定した。18個の細胞において-110mV (E_K より25mV陰性側)における内向きコードコンダクタンスおよび-60mV (E_K より25mV陽性側)における外向きコードコンダクタンスはそれぞれ $5.4 \pm 2.7\text{nS}$ および $3.1 \pm 1.6\text{nS}$ で、これらより内向き・外向きコードコンダクタンス比1.7が得られた。

膜電位を-20mVよりも陰性に保持した際には内向き整流K電流に遅延型外向きK電流が混入するが、後者は Cs^+ に感受性を欠くので (IV項参照)、この場合でも Cs^+ による内向き整流K電流の分離は可能である。このようにして保持電位を-70mVまで過分極させても、上記の内向き整流K電流の膜電位依存性は不変であった (図は省略)。

2. Kチャンネル阻害剤に対する感受性

以下に示すように新鮮ウシRPEにおいて細胞外 Cs^+ は内向き整流K電流を膜電位非依存的に阻害した。図1Eに内向き整流K電流振幅と Cs^+ 濃度との関係を示した。ある濃度の Cs^+ 存在下で残存するK電流の対照との比 (5例)を膜電位-36mVあるいは-120mVにおいて測定した。各膜電位における内向き整流K電流は以下の式によって計算された。

$$I_K = I_T - g_L (V_m - E_L) \quad \dots \dots \dots \text{式2}$$

$$g_L = \frac{I_L}{(E_L - E_K)}$$

ここで、 I_K は内向き整流K電流、 I_T は全ホールセル電流、 g_L は残存電流のコードコンダクタンス、 V_m は膜電位、 E_L は残存電流の平衡電位 (-36mV)、 I_L は E_K におけるホールセル電流 (これは残存電流のみを反映する)をあらわす。どの Cs^+ 濃度においても2つの異なる膜電位で測定された阻害率に有意差はなかった (t検定; $p < 0.01$)。よって Cs^+ による内向き整流K電流の阻害は膜電位に依存しないことが示唆される。図1Eの曲線は-36mVにおける測定値を以下の式に最小二乗法にて近似して得られた。

$$\frac{I_B}{I_C} = 1 - \left(\frac{[B]}{K_d + [B]} \right) \quad \dots \dots \dots \text{式3}$$

ここで、 I_B は阻害剤存在下での内向き整流K電流、 I_C は対照 (阻害剤投与前)の内向き整流K電流、 $[B]$ は阻害剤の濃度をあらわす。解離定数 (dissociation constant, K_d)は阻害率50%となる濃度である。この解析から得られた K_d は0.52mMであった。

一方 Ba^{2+} による内向き整流K電流の阻害は以下に示すように膜電位に依存した。図2Aに同じ細胞から記録された0.05mMの Ba^{2+} の細胞外灌流前後における2つのホールセル電流を示し

た。0.05mMの Ba^{2+} の存在下では内向き電流は時間依存性に減少し、膜がより過分極するほど減少の振幅はより大きくなった。図2Bに0.05mMの Ba^{2+} の存在下での膜電位刺激から10ミリ秒および996ミリ秒における電流・電圧関係を示した。両者の電流の差は膜電位がより過分極するほど大きくなった。これらの現象は膜電位がより過分極するほど Ba^{2+} による内向き整流K電流の阻害の程度がより大きくなることを反映していると考えられる。

図2Cに-36mVおよび-120mVの膜電位における内向き整流K電流の振幅と Ba^{2+} 濃度との関係を示した。電流の振幅は定常状態の時点で測定された。各膜電位における測定値を式3に近似して得られた曲線は膜電位の過分極とともに左に移動した。 Ba^{2+} による阻害の K_d は、-120mVでは $31\mu\text{M}$ 、-60mVでは $77\mu\text{M}$ (図では省略)、-36mVでは $128\mu\text{M}$ であった。

他のKチャンネル阻害剤の内向き整流K電流への影響についても下記のように調べた。20mMの TEA^+ は内向き整流K電流を変化させなかった。高濃度 (50~100mM) TEA^+ 溶液下では内向き整流K電流は幾分阻害されたが、これは TEA^+ との置換イオンである Na^+ の濃度減少に起因すると考えられる。

種々のKチャンネルの阻害剤であるキニジン ($100\mu\text{M}$)の細胞外投与は内向き整流K電流をほぼ完全に阻害した (4例)。グリベンクラミド (glibenclamide) ($100\mu\text{M}$)は内向き整流K電流を変化させなかった (2例)。

3. K^+ 選択性および細胞外 K^+ 濃度依存性

図3Aに同一の細胞において異なる $[\text{K}^+]_o$ (2, 5および20mM)において得られたホールセル電流の電流・電圧関係を示した。 $[\text{K}^+]_o$ の増加によって電流・電圧曲線はその形をあまり変えることなく右方向に移動した。一方 Cs^+ の存在下では $[\text{K}^+]_o$ を変えても電流・電圧曲線はほとんど変化しなかった (図3B)。 Cs^+ によって分離された内向き整流K電流の電流・電圧曲線は $[\text{K}^+]_o$ の変化に伴ってほぼ E_K の変化分だけ水平方向に移動した (図3C)。内向き整流Kチャンネルの透過性と $[\text{K}^+]_o$ との関係を調べるため、それぞれの $[\text{K}^+]_o$ において同一の駆動電圧によるコードコンダクタンスの大きさを計算し比較した。例えば $E_K \pm 25\text{mV}$ の膜電位で測定した外向きおよび内向きのコードコンダクタンス (この場合の駆動電圧は25mV)は、 $[\text{K}^+]_o$ の5mMから2mMへの減少によりそれぞれ対照 (5mM)の $134 \pm 11\%$ および $123 \pm 10\%$ に増加し、一方 $[\text{K}^+]_o$ の5mMから20mMへの増加によりそれぞれ対照の $50 \pm 11\%$ および $54 \pm 13\%$ に減少した (図3D)。

同時に得られた逆転電位は $[\text{K}^+]_o$ が2mM ($E_K = -106\text{mV}$)では $-104 \pm 3\text{mV}$ (5例)、5mM ($E_K = -83\text{mV}$)では $-83 \pm 6\text{mV}$ (25例)、20mM ($E_K = -48\text{mV}$)では $-51 \pm 5\text{mV}$ (5例)であった。以上の結果から得られた $[\text{K}^+]_o$ の10倍変化あたりの逆転電位の変化は53mVであり、あるチャンネルが完璧な K^+ 選択性を有する場合の値58mVに近似した。よってこの内向き整流チャンネルは高い K^+ 選択性を有すると考えられる。

4. 細胞内ATP依存性

穿孔パッチ法を用いた場合には、内向き整流K電流は通常60分以上にわたって安定に記録された。一方ホールセルパッチ法においては下記のように内向き整流K電流の活性はピペット内充填液のATP濃度に依存した。図4Aにホールセルパッチ法においてピペット内に2mMのATPを含有する場合の代表的なホールセル電流の経時的変化を示した。この細胞におい

て -36mV は高濃度 Cs^+ 存在下での残存電流の逆転電位であり、その電位での電流のほとんどは内向き整流Kチャンネルに由来する。また -83mV は内向き整流Kチャンネルの逆転電位であり、その電位での電流は内向き整流K電流以外の残存電流である。パッチ膜破砕直後の電流変化はドナン (Donnan) 電位の減少に起因すると考えられる。その後 -36mV におけるK電流は Cs^+ により可逆的に阻害されるまではほぼ一定であった。また電流・電圧関係から弱い内向き整流作用を有するK電流が維持されたことが確認された (図4B)。同様な結果は、 2mM あるいは 4mM のATPを含有するピペット内液を用いてホールセルパッチ法を行った他の11例においても観察された。

一方図4Cにホールセルパッチ法においてピペット内にATPを含まない場合の代表的なホールセル電流の経時変化を示した。この場合 -36mV におけるK電流は急激に減少し約8分以内に完全に消失した。その際の電流・電圧関係の変化から、消失した電流が内向き整流K電流であることが確認された (図4D)。同様な結果は他の10例においても観察された。以上の結果から、内向き整流K電流の活性の維持には細胞内ATPが必須であることが判明した。

IV. 遅延型外向き整流K電流

1. 膜電位依存性

図5Aに膜脱分極刺激により惹起される遅延型外向き整流K電流の典型例を示した。膜電位を -90mV に保持し -30mV あるいはより陽性の電位まで脱分極させると頂点に至ってからゆっくりと減衰する外向き電流が惹起された。一方図5Bのように同じ細胞で保持電位のみを -10mV に脱分極させた場合には、どの刺激膜電位においても惹起される電流は小さく時間依存性を有さなかった。これはすなわち遅延型外向き整流K電流が不活性化したことを示唆する。図5Aと5Bにおける電流の頂点振幅 (頂点が無い場合は平坦部の平均値) と膜電位との関係を図5Cに示した。保持電位が -90mV の際には優位を占めた

外向き整流の電流・電圧関係が、膜電位を刺激の間 -10mV に保持することによって完全に消失した。このようなウシRPEの遅延型外向き整流K電流は上記のような脱分極刺激を試したすべての細胞 (167例) において観察された。遅延型外向き整流K電流の特性を調べる際には持続型外向き整流K電流 (下記) を発現している細胞を対象から除外した。また必要に応じてATPを含有しないピペット内液を細胞内に拡散させるかあるいは高濃度の Cs^+ を含有する細胞外液を灌流するかのいずれかによって内向き整流K電流の混入を完全に除去した。

5mM K^+ を含有するリンゲルの灌流下では遅延型外向き整流K電流の開口閾値電位は -40mV 付近であった (図5A, 5C)。遅延型外向き整流K電流が由来するチャンネルの膜電位依存性を調べるために、外向き電流の頂点振幅から式1を用いてコードコンダクタンスを計算し、これと膜電位との関係を図6に示した。コードコンダクタンスの大きさは細胞によってばらつくので、各細胞における最大コードコンダクタンスに対する比を検討した。図6の曲線は各測定値を以下の Boltzmann の関数に最小二乗法にて近似させることによって得られた。

$$\frac{g}{g_s} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_m - V_{1/2}}{k_n}\right)} \quad \dots \dots \dots \text{式4}$$

ここで、 g はコードコンダクタンス、 g_s は最大 (飽和) コードコンダクタンス、 V_m は膜電位、 $V_{1/2}$ はコードコンダクタンスが最大の50%となる膜電位をそれぞれあらわす。 k_n は膜電位への依存度を意味する定数 (単位は mV) である。 5mM K^+ の存在下にてコードコンダクタンスは約 -40mV の閾値電位を有し、膜電位の陽性化にともなってS状に増加し、約 $+40\text{mV}$ 付近で飽和した。図6のようにホールセルパッチ法を用いた13個の細胞において 5mM K^+ の存在下での g_s は $8.5 \pm 2.8\text{nS}$ 、 $V_{1/2}$ は $+2.5 \pm 3.8\text{mV}$ 、 k_n は $-13.7 \pm 1.4\text{mV}$ であった。これら

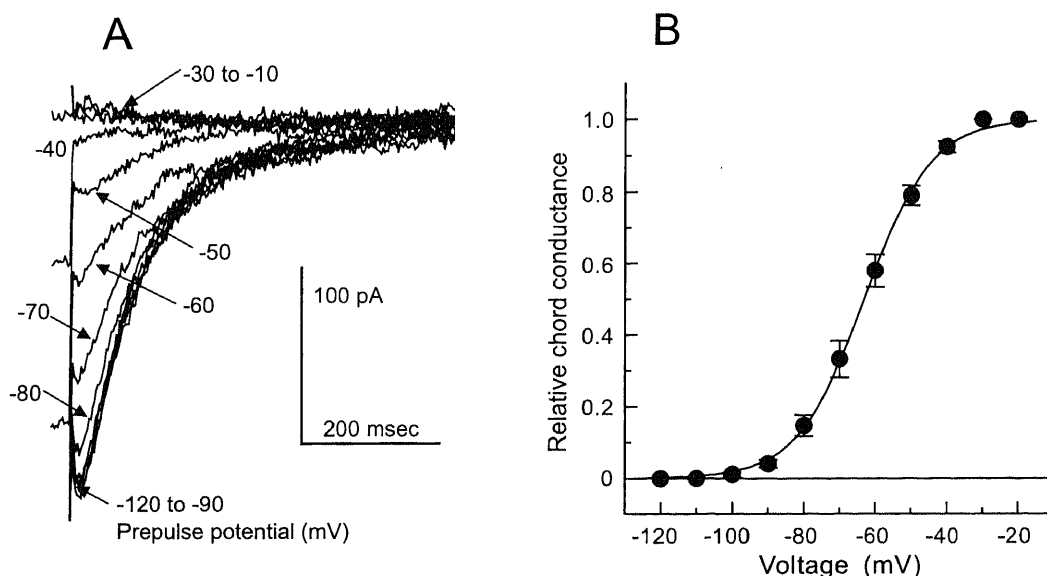


Fig. 12. Voltage-dependence of the sustained outwardly rectifying K channel. (A) Tail currents activating at -30mV following the prepulses to potentials indicated. The cell was bathed in the standard Ringer solution and recorded in the whole-cell-patch configuration with 4mM ATP in the pipette solution. (B) Conductance-voltage relationship. The chord conductance was calculated by the equation (7), and was normalized to a maximum value in each cell. Each symbol and error bar represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$ for 10 cells. The smooth curve is the least-squares fit of the data to the equation (4) with values of $V_{1/2} = -63.1\text{mV}$ and $k_n = -9.3\text{mV}$.

と穿孔パッチ法にて得られた値 ($g_s = 8.3 \pm 1.9 \text{ nS}$, $V_{1/2} = +6.8 \pm 2.4 \text{ mV}$, $k_n = -13.3 \pm 1.4 \text{ mV}$, 10例) との間には統計学的な有意差はなかった。

2. K^+ 選択性

図7Aに+30mV, 240ミリ秒の脱分極刺激にひき続く-100mVから-50mVの範囲での膜過分極によって惹起された電流を示した。このように遅延型外向き整流K電流が頂点に達した直後に膜電位を過分極電位に戻すと、チャンネルが閉じる過程(非活性化)に由来するテール電流(tail current)が観察された。図7Aの生波形に重なる滑らかな曲線で示したように、電流の減衰は指数関数の近似曲線によく適合し、その極性は-70~-80mVにて逆転した。図7Bに示したように、各膜電位でのテール電流振幅から近似直線を求め、それがx軸と交差する点の電位(この細胞では-74mV)をテール電流の逆転電位とした。7個の細胞において $[\text{K}^+]_o$ が5mM ($E_K = -83 \text{ mV}$)の際の逆転電位は $-72.2 \pm 4.6 \text{ mV}$ であった。

一方 $[\text{K}^+]_o$ が140mM ($E_K = 0 \text{ mV}$)の場合には、膜脱分極刺激に

より惹起される遅延型外向き整流K電流の極性が E_K 近傍にて逆転した。図7Cにその代表例を示した。頂点を有する電流は、+3mVより陽性の刺激電位では外向き、+3mVより陰性の刺激電位では内向きであった。この際の逆転電位は頂点電流振幅と電圧の関係によって(図7D)より詳細に計測された。10個の細胞において $[\text{K}^+]_o$ が140mMの際の逆転電位は $-2.6 \pm 1.5 \text{ mV}$ であった。 $[\text{K}^+]_o$ が70mM ($E_K = -17 \text{ mV}$)の場合にも、活性化された遅延型外向き整流K電流の極性が同様に E_K 近傍にて逆転した(図は省略)。6個の細胞において $[\text{K}^+]_o$ が70mMの際の逆転電位は $-11.3 \pm 1.8 \text{ mV}$ であった。

以上の結果から得られる $[\text{K}^+]_o$ の10倍変化あたりの遅延型外向き整流K電流の逆転電位の変化は52.1mVであり、完璧な K^+ 選択性を有する場合の値58mVに近似した。従って遅延型外向き整流Kチャンネルは高い K^+ 選択性を有すると考えられる。

3. 活性化, 非活性化の時間依存性

図8Aに-10mVから+40mVの膜脱分極刺激により惹起され

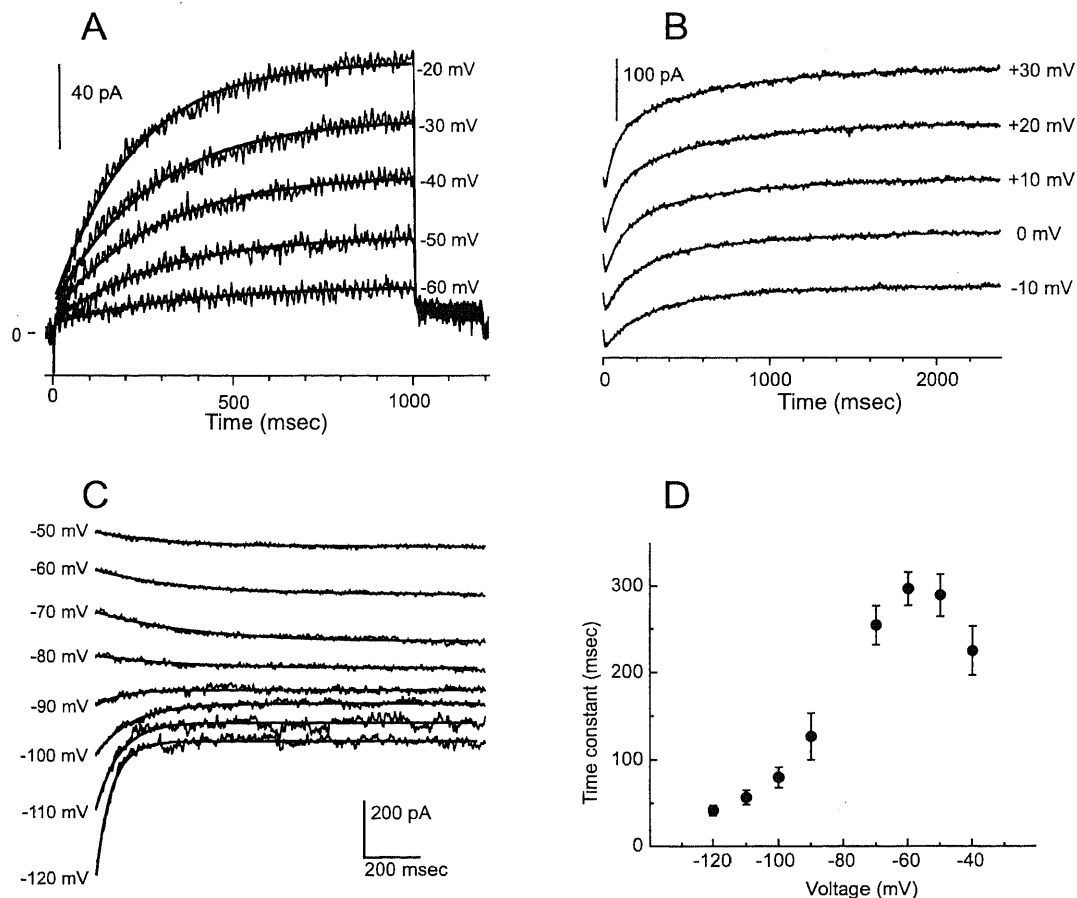


Fig. 13. Activation- and deactivation-kinetics of the sustained outwardly rectifying K current. (A) Time course of activation. Currents were evoked from a holding potential of -70 mV by voltage-pulses to the potentials indicated. The perforated-patch configuration was applied. Each noisy trace is the average of three separate runs. The perfusate contained 100 mM TEA^+ and 20 mM Cs^+ . Leak currents were subtracted. Smooth traces show exponential fits of the currents. (B) Time course of activation in another cell. The perfusate was same as in (A). Currents were evoked from a holding potential of -70 mV by voltage-pulses to the potentials indicated. The smooth trace shows the least-squares fit of the data to either a single exponential function (-10 mV) or an equation which consists of two exponential functions (0 mV and more positive potentials). (C) Time course of deactivation. The noisy traces represent deactivating currents produced by hyperpolarizing the membrane from a holding potential of -30 mV to voltages indicated. The smooth traces are exponential fits of the currents. The whole-cell-patch configuration was applied with 4 mM ATP in the pipette. The perfusate was the standard Ringer solution. (D) Voltage-dependence of the deactivation time constant. Each symbol and error bar represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$ for 8 cells.

た遅延型外向き整流K電流の代表例を示した。外向き電流は刺激開始からわずかに遅れて立ち上がり、いわゆるS状の時間経過を呈した。この時間経過は刺激電位がより脱分極するほど速くなった。この活性化の波形は以下のHodgkin-Huxleyの n^2 モデル式によく適合した。

$$I = I_p [1 - \exp(-t/\tau)]^2 \dots \dots \dots \text{式5}$$

ここで、 I は刺激開始からの時間 t における電流振幅、 I_p は頂点電流振幅、 τ は時定数をそれぞれあらわす。図8Bに6例から得られた活性化の時定数と膜電位との関係を示した。例えば活性化の時定数は -10mV では 38.3 ± 5.9 ミリ秒、 $+40\text{mV}$ では 9.0 ± 1.5 ミリ秒であった。

チャンネルの活性化に引き続いて膜電位を過分極させると、チャンネルの非活性化を反映した時間依存性の電流変化が観察され、図7Aにその代表例を示した。非活性化の時間経過は指数関数の近似曲線によく適合し、膜電位がより過分極するほど速くなった。図8Cに7例から得られた非活性化の時定数と膜電位との関係を示した。例えば -120mV では 9.4 ± 4.1 ミリ秒であった非活性化の時定数は -60mV では 23.3 ± 8.3 ミリ秒と増加した。

4. 不活性化過程

膜脱分極の持続によって遅延型外向き整流K電流は不活性化を呈した。図9Aに膜電位を -10 から $+40\text{mV}$ の範囲で1秒間脱分極させたときに観察される不活性化電流の典型例を示した。図9Aにおいて生波形に重なった滑らかな曲線で示したようにその時間経過は指数関数モデルによく適合した。図9Bに図9Aにて得られた不活性化の時定数と膜電位との関係を示した。膜電位が -10mV から $+40\text{mV}$ の範囲では不活性化の時定数は膜

電位に依存せずほぼ一定であった。

不活性化の時定数には細胞によってかなりのばらつきがみられた。15個の細胞においてホールセルパッチ法の確立後5分から15分の時点で膜を $+40\text{mV}$ に脱分極して得られる不活性化の時定数の $\bar{x} \pm \text{SD}$ は 1418 ± 755 ミリ秒、その範囲は $357 \sim 2722$ ミリ秒であった。不活性化の時定数は穿孔パッチ法ではより大きくなり、8個の細胞においてその $\bar{x} \pm \text{SD}$ は 3559 ± 893 ミリ秒、その範囲は $2234 \sim 4607$ ミリ秒であった。従って細胞質内のある物質によって不活性化が制御されている可能性がある。

刺激電位が -10mV よりも陰性側においては、時間経過の遅い活性化電流が混入するので(図5Aを参照)、不活性化の時定数を図9Aのように直接的に測定することは困難である。これを克服するためにエンベロープ試験(上記)を用い、その代表例を図9Cに示した。例えば -20mV における不活性化過程を調べる際には、図9Cの上に示したように異なる持続時間の -20mV の前刺激に引き続く $+40\text{mV}$ 、500ミリ秒の脱分極刺激によって遅延型外向き整流K電流を活性化させた。 -20mV の前刺激時間が長くなるほど不活性化が進行し、頂点振幅は減少した。この頂点振幅減少の時間経過はすなわち -20mV における不活性化の過程を意味する。図9C下に示したように -40mV においては不活性化はより遅く、かつより不完全となった。図9Cに示したように不活性化の時間経過は指数関数の近似曲線によく適合した。これらの不活性化の時定数は -20mV および -40mV においてそれぞれ0.9秒および2.2秒であった。同様の方法で測定した各膜電位における不活性化の時定数を図9Bに示した。0mVより陰性の膜電位において不活性化の時定数は膜電位に依存した。同様の傾向はホールセルパッチ法あるいは穿孔パッチ法にて記録した他の6例においてもみられた。

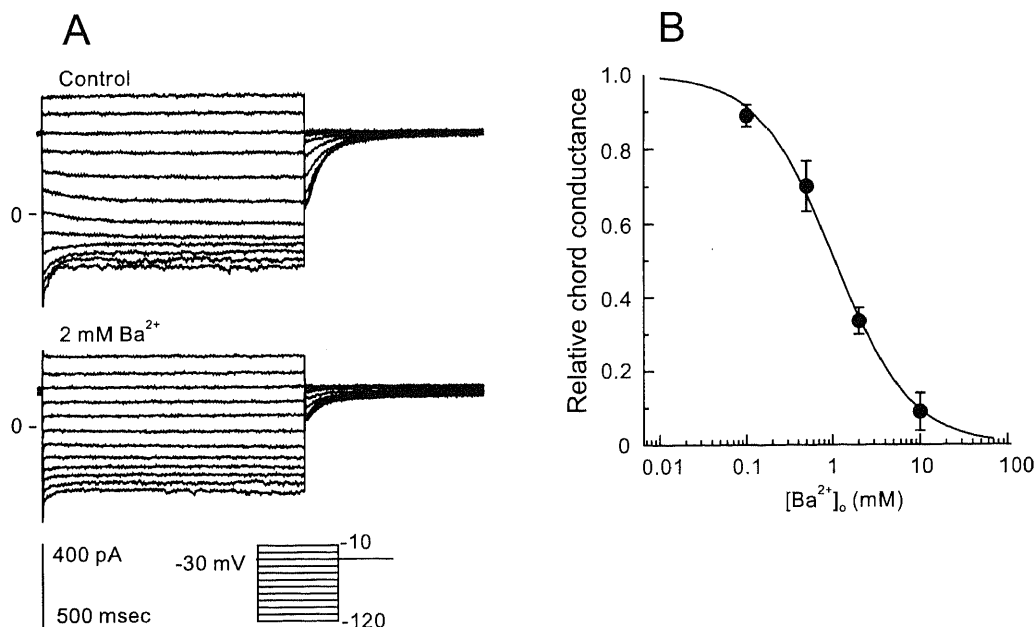


Fig. 14. Sensitivity of the sustained outwardly rectifying K current to external Ba^{2+} . (A) Families of whole-cell currents measured in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of 2 mM Ba^{2+} in the bath. The whole-cell-patch configuration was applied with 4 mM ATP in the pipette solution. The control perfusate contained 20 mM TEA^+ and 5 mM Cs^+ . (B) Concentration-dependence of the Ba^{2+} -induced block. Each symbol and error bar represents $\bar{x} \pm \text{SEM}$ for 3 to 8 cells. For each cell, the maximum chord conductance in the presence of Ba^{2+} was calculated from the tail currents using the equation (7), and then was normalized to the value determined in the absence of Ba^{2+} . The curve is the least-squares fit of the data points to the equation (3) with K_a of 1.1 mM .

図5Bに示したように膜電位を脱分極電位で長時間(約15秒以上)保持すると遅延型外向き整流K電流は完全に不活性化された。定常状態の不活性化は、膜電位を様々な電圧に30秒以上固定した後に同一の脱分極刺激を与えることによって調べられた。このような実験の1例を図9Dに示した。脱分極刺激で活性化される電流は、 -60mV より陰性の保持電位では変化がなかったが、 -60mV より陽性電位では徐々に減弱し、 -10mV より陽性電位では完全に消失した。図9Dの曲線は各測定値を以下の Boltzmann の関数に最小二乗法にて近似させることによって得られた。

$$\frac{I_p}{I_s} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{V_h - V_{1/2}}{k_n}\right)} \quad \dots \dots \text{式6}$$

ここで、 I_p は外向き電流の頂点振幅、 I_s は外向き電流の頂点振幅の最大値、 V_h は脱分極刺激前の保持電位、 $V_{1/2}$ は外向き電流の頂点振幅が最大値の50%となるときの保持電位をそれぞれあらわす。 k_n は膜電位への依存度を意味する定数である。図9Dの例において $V_{1/2}$ は -35.1mV 、 k_n は 8.5mV であった。同様の結果は他の2例でもみられ、計3例において $V_{1/2}$ は $-36.5 \pm 2.1\text{mV}$ 、 k_n は $9.2 \pm 0.7\text{mV}$ であった。この結果から、保持電位を -70mV よりも陰性に設定すれば最大活性化電流が得られること、また保持電位を -10mV よりも陽性に設定すれば遅延型外向き整流K電流を完全に不活性化できることが確認された。

5. Kチャンネル阻害剤に対する感受性

ウシRPEの遅延型外向き整流K電流において、まずTEA⁺の

阻害作用に関して以下のように検討した。図10Aに対照リンゲル液および20mM TEA⁺溶液の灌流下で同一の細胞から記録された遅延型外向き整流K電流を示した。この細胞において20mMのTEA⁺は遅延型外向き整流K電流の80%を阻害した。図10Bに4例から得られた様々なTEA⁺濃度における遅延型外向き整流K電流の頂点振幅比を示した。図10Bの曲線は各測定値を式3に近似させることによって得られ、このときの K_d は 5.1mM であった。

次にKチャンネル阻害剤、4-APの遅延型外向き整流K電流に対する阻害作用を検討した。3例において1mMおよび5mMの4-APの阻害率はそれぞれ $29.7 \pm 3.2\%$ および $45.3 \pm 2.1\%$ であった。4-AP濃度を10mMに増加しても阻害率は $43.7 \pm 3.5\%$ と増加しなかった(5例)。100 μM のキニジンは遅延型外向き整流K電流をほぼ完全に阻害した(5例)。

一方細胞外Ba²⁺の遅延型外向き整流K電流に対する阻害作用はわずかで、例えば2mMおよび10mMのBa²⁺の阻害率はそれぞれ $5.0 \pm 3.0\%$ (5例)および $24.5 \pm 7.9\%$ (3例)であった。細胞外に投与されたCs⁺(5~20mM, 9例)あるいはカリブドトキシシン(5nM, 3例)は遅延型外向き整流K電流の振幅および時間経過を変化させなかった。

V. 持続型外向き整流K電流

1. 膜電位依存性

調べたすべてのウシRPE細胞の約24%(185例中44例)において、長時間の脱分極によっても全く不活性化されずにその活性が持続する外向きK電流が観察された。この持続型外向き整流K電流は下記のように膜電位依存性、時間経過および阻害剤

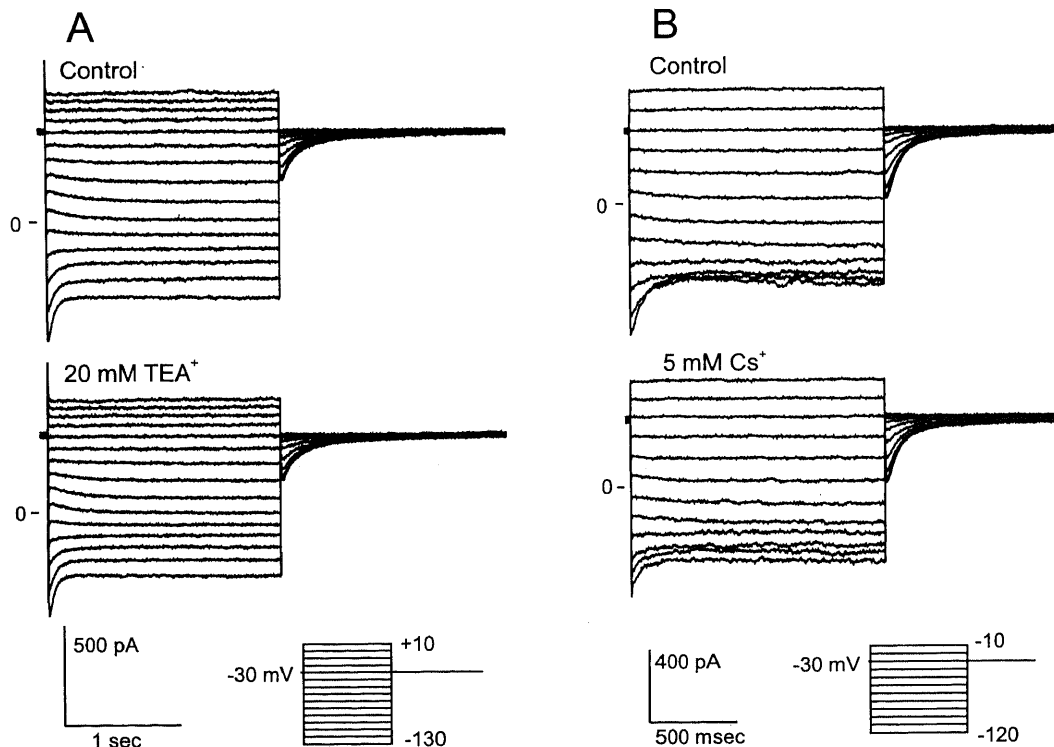


Fig. 15. The effects of external TEA⁺ and Cs⁺ on the sustained outwardly rectifying K current. (A) Families of whole-cell currents recorded in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of 20 mM TEA⁺ in the bath. The control perfusate was the standard Ringer solution. (B) Families of whole-cell currents recorded in the absence (upper panel) and presence (lower panel) of 5 mM Cs⁺ in the bath. The control perfusate contained 20 mM TEA⁺.

に対する感受性の観点において遅延型外向き整流K電流とは明らかに異なった。持続型外向き整流K電流を遅延型外向き整流K電流から分離して解析する際には、保持電位を脱分極させて後者を完全に不活性化させるか、あるいは高濃度TEA⁺溶液を灌流して後者を阻害した(Ⅳ項参照)。また下記のように時間依存性の成分のみを解析することによって内向き整流K電流の混入を回避した。

図11Aおよび11Bに50mM TEA⁺を含む溶液の灌流下で同一の細胞から記録されたホールセル電流を示した。この濃度のTEA⁺によって遅延型外向き整流K電流はほぼ完全に阻害された(図10B参照)。この細胞においては保持電位-80mVからの脱分極刺激によって緩徐に立ち上がる外向き電流が惹起され、少なくとも2.4秒間それは不活性化されなかった(図11A)。一方膜電位を-10mVに保持した場合には(図11B)、過分極刺激によって時間依存性に変化する電流(current relaxation)が惹起され、その極性は約-80mVすなわちE_K付近において逆転した。従ってこの電流成分はKチャンネルに由来し、これが閉じる(非活性化する)過程を反映すると考えられる。また膜電位が各刺激電圧から-10mVに戻る際には外向きに時間依存性に増大するテール電流が観察された。このテール電流はチャンネルが開く(活性化する)過程を反映すると考えられる。

図11Cに-80mVおよび-10mVの保持電位から惹起されたホールセル電流の定常状態での電流・電圧関係を示した。2つの電流・電圧関係がほぼ一致したことから、このチャンネルは-10mVの保持電圧では完全に開いており、刺激間隔である15秒の間全く不活性化されないと考えられる。図5Cと図11Cを比較すると、この持続型外向き整流K電流の保持電位への依存性が遅延型外向き整流K電流のそれと全く異なることは明確である。保持電位を-80mVに設定した際の刺激開始直後(10ミリ秒後)の電流・電圧関係と定常状態の時点でのそれとの比較から(図11C)、持続型外向き整流K電流は-60mVよりも陽性の電位刺激によって活性化されることが示唆される。

開口閾値電位と推定される-60mV付近では活性化の時間経過が遅く、かつE_Kに近くてチャンネルの駆動電圧が小さいので、活性化電流が過小評価される可能性がある。従って持続型外向き整流Kチャンネルの透過性と電圧との関係を調べる際には脱分極電位におけるテール電流(上記)を解析した。図12Aに膜電位を各前刺激電位から保持電位である-30mVに戻したときに記録されたテール電流を示した。ここで基線を越えて外

向きに活性化される電流は観察されないで、この電圧固定プロトコルでは遅延型外向きK電流を無視できると考えられる。前刺激電位が-120mVから-90mVの範囲ではテール電流は同じ電流レベルから始まり、新たな定常状態レベルにまで指数関数的に変化した。次に前刺激電位が-80mVから-40mVの範囲ではテール電流はより陽性の電流レベルから始まって先と同じ定常状態レベルにまで変化した。最後に前刺激電位が-30mVから-10mVの範囲ではテール電流はほぼ基線に一致して一定であった。これらの結果から、持続型外向き整流K電流は-90mVより陰性電位では完全に非活性化され、-80mVから-40mVの範囲では部分的に活性化され、-30mVより陽性電位では完全に活性化されると考えられる。このチャンネルが指数関数的に開閉しかつ不活性化されないことから、各膜電位におけるコードコンダクタンスは以下の式によって表わされる。

$$g = g_s - \Delta g(-30) \quad \dots \dots \text{式7}$$

ここで、 g はコードコンダクタンス、 g_s はコードコンダクタンスの最大値、 $\Delta g(-30)$ は膜電位を-30mVに戻すことにより変化したコードコンダクタンス(各テール電流振幅を膜電位が-30mVの際の駆動電圧である53mVで除した値に等しい)をそれぞれあらわす。このようにテール電流から計算された最大コードコンダクタンスは計10例において $3.4 \pm 2.3nS$ であった。図12Bに10例の各細胞において最大値で標準化したコードコンダクタンス比と電圧との関係を示した。図12Bの曲線は式4による近似曲線で、 $V_{1/2}$ は-63.1mV、 k_n は-9.3mVであった。この結果、持続型外向き整流Kチャンネルの開口閾値電位は-90mV付近であることが判明した。

2. K⁺選択性

図11Bや図13Cに示したように過分極刺激によって時間依存性に変化する電流の極性はE_K付近で逆転した。個々の細胞における逆転電位はその電流変化の振幅と膜電位との関係から求められた(図は省略、Ⅳ-2項参照)。 $[K^+]_o$ が5mMの際の逆転電位は $-84 \pm 4mV$ (12例)であり、E_K(-83mV)に近似した。 $[K^+]_o$ が20mM(E_K=-48mV)の際の逆転電位は $-46 \pm 5mV$ (3例)、2mM(E_K=-106mV)の際の逆転電位は $-98 \pm 1mV$ (3例)であった。以上の結果から得られた $[K^+]_o$ の10倍変化あたりの逆転電位の変化は52mVであり、完璧なK⁺選択性を有する場合の値58mVに近似した。従って持続型外向き整流Kチャンネル

Table 1. Difference between two types of outwardly rectifying K channels in bovine RPE

Channel type	Chord conductance-voltage relationship			Activation kinetics	Inactivation	Deactivation time constant at -60mV(msec)	K _d for Ba ²⁺ -induced inhibition (mM)	K _d for TEA ⁺ -induced inhibition (mM)
	g_s (nS)*	$V_{1/2}$ (mV)*	k_n (mV)*					
Delayed outwardly rectifying K channel	8.5	+3	-14	Hodgkin-Huxley, n ² model	Present	23	>10	5.1
Sustained outwardly rectifying K channel	3.4	-63	-9	Exponential model	Absent	297	1.1	>50

* Parameters in the equation (4).

は高いK⁺選択性を有すると考えられる。

3. 活性化と非活性化の時間経過

図13Aに-60mVから-20mVの刺激によって活性化された持続型外向き整流K電流の一例を示した。ここで内向き整流K電流および遅延型外向き整流K電流はそれぞれ細胞外溶液中の20mM Cs⁺および100mM TEA⁺によってあらかじめ阻害された。これらの阻害剤は持続型外向き整流K電流の活性化の時間経過には影響を与えなかった。図13Aの生波形に重なった滑らかな曲線にて示したように活性化の時間経過は指数関数の近似曲線によく適合した。多くの例で-10mVより陽性電圧の刺激による活性化電流の時間経過は以下のようにより複雑であった。図13Bに細胞外の20mM Cs⁺および100mM TEA⁺の存在下において-10mVから+30mVの刺激によって惹起された持続型外向き整流K電流を示した。-10mVにおける活性化の時間経過は1つの指数関数曲線によく適合したが、より陽性電位における活性化の時間経過の近似には2つの指数関数の和を要し、この際のより遅い時定数は500~1000ミリ秒であった。

図13Cに標準リングル液灌流下の細胞において膜電位を-30mVの保持電位からより陰性の各膜電位に変化させることにより惹起された持続型外向き整流K電流の非活性化過程を示した。この保持電圧では遅延型外向き整流K電流成分の混入はみられず(上記)、また内向き整流K電流は時間依存性を有しないので、Kチャンネル阻害剤を用いなくても持続型外向き整流K電流の非活性化過程の分離・解析が可能である。図13Cの滑らかな曲線にて示したように、この非活性化電流波形は指数関数の近似曲線によく適合した。図13Dに同様の解析を行った計8例から得られた非活性化の時定数と膜電位との関係を示した。非活性化の時定数は-120~-60mVの範囲では脱分極に伴って増加し、-60mV付近にて最大となり、さらに脱分極すると減少した。例えば非活性化の時定数の \pm SEMは-120mVでは42 \pm 6ミリ秒、-60mVでは297 \pm 19ミリ秒であった。持続型外向き整流K電流の非活性化の時定数は遅延型外向き整流K電流のその約10倍であった。

4. Kチャンネル阻害剤に対する感受性

図14Aに2mM Ba²⁺溶液の灌流前後において記録されたホールセル電流の一例を示した。2mM Ba²⁺によって持続型外向き整流Kチャンネルに由来する過分極刺激によって時間依存性に変化する電流成分およびテール電流の振幅が低下した。図14Bに8個の細胞から得られた持続型外向き整流Kチャンネルのコードコンダクタンスと細胞外Ba²⁺濃度との関係を示した。滑らかな曲線にて示したように各測定値は式3の近似式によく適合し、その際のK_dは1.1mMであった。

図13AおよびBに示したように持続型外向き整流K電流は100mM TEA⁺によっても完全には阻害されなかった。図15Aに示したように20mM TEA⁺は時間依存性の成分をほとんど変化させなかった。4例において20mM TEA⁺存在下での持続型外向き整流K電流の最大コードコンダクタンスは対照の95.1 \pm 3.9%であった。

図15Bに5mM Cs⁺の細胞外投与の前後におけるホールセル電流を示した。Cs⁺は持続型外向き整流Kチャンネル由来のテール電流振幅をほとんど変化させなかった。6例において5mM Cs⁺の存在下でのテール電流振幅から計算された定常状態の最大コードコンダクタンスは対照の97.4 \pm 12.8%であった。一方図15Bに示したように5mM Cs⁺は過分極電位における時間依存

性電流成分をかなり減弱させた。同様の傾向は他の5例においても観察され、Cs⁺が持続型外向き整流K電流を膜電位依存的に阻害することが示唆される。

考 察

本研究によって、RPEのイオンチャンネル研究のモデルとして酵素的に単離された新鮮なウシRPE細胞を利用できることが明らかとなった。他の種から分離したRPE細胞¹²⁾¹⁴⁾と同様に、単離ウシRPE細胞は形態的に極性を有し、その微絨毛突起側では多数の突起が観察された。ウシRPE細胞の平均静止膜電位は-64mV(185例)であり、Josephら⁹⁾による新鮮ウシRPE・脈絡膜組織片の灌流実験において(5mM [K⁺]_o, 35°C)細胞内微小電極を介して測定されたRPEの静止膜電位に近似した。

ウシRPEに発現していた3種類のK電流は上記のように膜電位依存性、時間依存性およびKチャンネル阻害剤に対する感受性の観点において互いに異なっていた。

本研究におけるウシおよび近年報告された両性類¹²⁾²¹⁾の新鮮単離RPEに発現している内向き整流K電流に共通する特性は以下のものであった。その1として、内向き整流K電流は膜電位の変化により速やかに(10ミリ秒未満)定常レベルに達し、時間が経過しても減衰しなかった。すなわち時間依存性を呈さなかった。その2として、内向きの整流作用は弱く、このためにRPEの生理的膜電位である-70~-50mVにおいても内向き整流Kチャンネルは幾分開いている。従ってこのチャンネルは静止膜電位を決定するKコンダクタンスの成分であると考えられる。その3として、内向き整流電流はKチャンネル阻害剤であるCs⁺およびBa²⁺により濃度依存的に阻害された。他の組織にみられる内向き整流K電流において、細胞外Cs⁺あるいはBa²⁺による電流の阻害は通常は膜電位依存性である²⁴⁾²⁵⁾。すなわち膜電位がより陰性になるほど阻害率はより大きくなる。しかし両生類の新鮮単離RPEにおいてはCs⁺あるいはBa²⁺による内向き整流K電流の阻害は膜電位に依存しない²¹⁾。ウシRPEの内向き整流K電流に対する細胞外Cs⁺による阻害作用も膜電位に依存せず、K_d値で0.52mMを示した。この値はカエルRPEにおけるK_d値0.79mMに近似した²¹⁾。一方ウシRPEの内向き整流K電流の細胞外Ba²⁺に対する感受性は膜電位に依存した。Ba²⁺による阻害作用が膜電位依存的であることは、チャンネルでのBa²⁺の結合部位が膜の表面ではないことを示唆する²⁶⁾。

従来より報告されている他の組織の内向き整流Kチャンネルにおいては通常は[K⁺]_oが増加するに伴ってチャンネルの透過性も増大する²⁵⁾²⁷⁾。しかしウシRPEの内向き整流Kチャンネルのコードコンダクタンスは2~20mMの範囲における[K⁺]_oの増加に伴って減少した。光刺激による視細胞の過分極に伴って網膜下腔のK⁺濃度はおよそ5mMから2mMにまで減少し(ネコ)²⁸⁾、その際RPEの微絨毛突起側KコンダクタンスはK⁺を細胞外に放出することによって網膜下腔のK⁺濃度を緩衝する働きを有すると考えられる。RPEにおいて内向き整流Kチャンネルが微絨毛突起側Kコンダクタンスに相当することが間接的に証明されており²⁹⁾、低い[K⁺]_oで内向き整流Kチャンネルの透過性が増大することは、網膜下腔の光刺激によるK⁺濃度減少を緩衝するうえで好都合である。

RPEの内向き整流チャンネルの定常状態活性に細胞内ATPが不可欠であるといった新発見が得られた。すなわちATPを含まないピペット内液をホールセルパッチ法により細胞内へ拡散さ

せると内向き整流Kチャンネルの活性は数分のうちに消失した。一方2~4mMのATPを細胞内へ拡散させると同チャンネルの活性は10分以上にわたり持続した。ATPによるチャンネル活性の制御に関しては様々な種類の内向き整流Kチャンネルにおいて報告されている。例えばATP感受性Kチャンネルに対する細胞内ATPの効果は二面性を有する。すなわち低濃度の(0.1mM程度)ATPはチャンネルの磷酸化機構を介してその定常活性を維持するが³⁰⁾³¹⁾、高濃度の(2mM程度以上)ATPはチャンネルへの非加水分解的な結合を介してその活性を阻害する³²⁾³³⁾。ただしウシのRPEの内向き整流K電流ではATP感受性Kチャンネルの阻害剤であるグリベンクラミド³⁴⁾に感受性がなかったため、両者が同類のチャンネルであるとは考えられない。同様にチャンネル活性の維持にATPの結合が不可欠である内向き整流Kチャンネルは他にも例があるが³⁵⁾³⁶⁾、その際にはATPの加水分解を伴うことが示唆されている。ウシRPEのホールセルパッチ法においては、十分なATP(4mM)を含むピペット内液からMg²⁺を除去すると内向き整流Kチャンネルの活性が消失した(図は省略、5例)。従ってその活性の維持にはATPの加水分解が必要であることが示唆される。

脱分極刺激を試みたすべてのウシRPE細胞において観察された緩徐な不活性化を伴う外向き電流は、その膜電位依存性、時間経過および阻害剤に対する感受性の観点から、他の組織細胞³⁷⁾³⁸⁾およびカエルRPE¹²⁾においてみられる遅延型外向き整流K電流に類似していた。その活性化過程はHodgkin-Huxleyのn²モデルによく適合し、このチャンネルが複数の閉状態を有することが示唆される³⁹⁾。不活性化の時定数は陽性の膜電位においてはほぼ一定であったが、コンダクタンスが部分的にしか開いていないより陰性の膜電位においては増加した。この結果から、RPEの遅延型外向き整流Kチャンネルも不活性化は閉状態からは起こらないとするモデル²²⁾に従うと考えられる。

ウシRPEの遅延型外向き整流Kチャンネルの開口閾値電位は約-40mVであった。すなわちこのチャンネルは定常のRPEの静止電位より少なくとも10mV脱分極しないと開口しない。従って生理的状态で遅延型外向き整流Kチャンネルが静止Kコンダクタンスとして機能しているとは考えられない。

調べた細胞の約24%において、脱分極刺激を持続しても不活性化しない外向き整流K電流がみられた。この持続型外向き整流K電流は以下の観点によって遅延型外向き整流K電流とは明らかに区別される(表1参照)。その1として、保持電位を0mV付近に設定すると、遅延型外向き整流K電流は完全に不活性化したが、持続型外向き整流K電流の活性は持続した。その2として、電流の活性化および非活性化の時間経過から推察されるチャンネルの開閉モデルは持続型外向き整流K電流においてより単純である。その3として、チャンネルの開口閾値電位は互いに約50mV異なっていた。その4として、持続型外向き整流K電流のTEA⁺およびBa²⁺に対する感受性は遅延型外向き整流K電流のそれらに比べそれぞれ10分の1未満および10倍以上であった。

持続型外向き整流K電流は膜電位依存性、時間依存性および阻害剤に対する感受性において神経細胞¹⁵⁾、平滑筋細胞⁴⁰⁾あるいは神経芽細胞腫・膠腫ハイブリッド細胞⁴¹⁾などにみられるM電流やサンショウウオの杆体細胞におけるM様電流⁴²⁾に類似していた。M電流の特徴はムスカリンおよびそのアゴニストによって抑制されることである¹⁵⁾⁴³⁾。しかしながらウシRPEの持続

型外向き整流K電流はムスカリンのアゴニストの一つカルバコール(0.2~100μM)によって抑制されなかった(3例)。M電流に関する報告は興奮性細胞に限られており、非興奮性細胞であるRPEではこのチャンネルの制御様式が異なる可能性がある。

ウシRPEの持続型外向き整流K電流は、新鮮単離されたヒトRPEの持続型外向き整流K電流¹⁴⁾に極めて類似していた。すなわち両者は同様に指数関数的に活性化され、ゆっくりと非活性化され、高濃度の細胞外Ba²⁺によって阻害され、細胞外TEA⁺には感受性を示さなかった。またヒトおよびウシRPEの持続型外向き整流K電流の活性化閾値電位は静止膜電位よりも陰性側にあった。すなわち持続型外向き整流Kチャンネルは静止膜電位において開いており、静止Kコンダクタンスとしての役割を担っていることがウシにおいても確認された。

これまでにヒト以外の種(両生類あるいはラット)のRPEにおいて持続型外向き整流K電流が記録されたことはなかったため、ヒトにおけるその発現には疑問点が残っていた¹⁴⁾。すなわちヒトRPE細胞は死後数時間を経たアイバンクの眼球から分離されたため、持続型外向き整流Kチャンネルの発現には死後変化が関与している可能性が否定できなかった¹⁴⁾。しかし今回、死後短時間で細胞の単離が可能であるウシRPEにおいても持続型外向き整流Kチャンネルの発現を確認できたことから、このチャンネルは内向き整流Kチャンネルと同様に生体RPEでも活性化していると考えられる。

RPEの微絨毛突起側および基底側に存在する静止KコンダクタンスはRPEの細胞内と網膜下腔および脈絡膜との間でK⁺を受動的に輸送することによって、視細胞周囲およびRPE自体のK⁺に関わる微細環境を維持している⁴⁵⁾⁴⁶⁾。また微絨毛突起側および基底側の膜電位はこれら静止Kコンダクタンスによって決定される⁴⁶⁾。

RPEの静止Kコンダクタンスに相当するKチャンネルを特定する研究は下記のように最近になって進展がみられた。カエルのRPE・脈絡膜切片を用いた実験²⁹⁾において微絨毛突起側の静止Kコンダクタンスの阻害剤に対する感受性が内向き整流Kチャンネルのそれ¹²⁾²¹⁾に極めて近似したことから、微絨毛突起側の静止Kコンダクタンスは主に内向き整流Kチャンネルにより構成されることが証明された。上記のようにウシRPEの内向き整流Kチャンネルの特性はカエルRPEのそれに類似していたことから、ウシRPEにおいてもこのチャンネルが微絨毛突起側の静止Kコンダクタンスを構成していると考えられる。これはさらに、上記のようにチャンネルのコードコンダクタンスと[K⁺]_oとの関係が網膜下腔の光刺激によるK⁺濃度減少を緩衝するうえで好都合であった結果からも支持される。

RPEの基底側の静止Kコンダクタンスに関しては未だ充分には解明されていないが、それが高濃度のBa²⁺によって阻害されることがRPE・脈絡膜標本に微小電極を刺入した実験により判明している³⁹⁾⁴⁴⁾。ウシRPEで同程度のBa²⁺に対する感受性を示したのは持続型外向き整流Kチャンネルのみであった。従ってこのチャンネルが基底側に局在し、静止Kコンダクタンスを構成している可能性がある。

持続型外向き整流K電流の発現率が24%であった理由の詳細は不明である。ただし後の研究でサルRPEにおいて細胞内Ca²⁺濃度をCaイオノフォアであるイオノマイシン(1~2μM)で上昇させると内向き整流K電流は減衰し、持続型外向き整流K電流が増大する例があった(未発表)。従って持続型外

向き整流K電流が観察されなかったウシRPEでは細胞内Ca²⁺に依存する制御機構によってその活性が抑制されていた可能性がある。

結 論

新鮮な網膜から単離されたウシRPE細胞のホールセル電流をパッチクランプ法を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. 単離ウシRPE細胞は形態的に極性を有し、185個の細胞における平均静止膜電位は-64mVであった。
2. ウシRPEには1つの内向き整流Kチャンネルと2種類の外向き整流Kチャンネルが発現していた。
3. ウシRPEの内向き整流Kチャンネルは膜電位依存性および阻害剤に対する感受性において両生類RPEのそれに類似しており、RPEの微絨毛突起側の静止Kコンダクタンスを構成すると思われる。
4. 内向き整流Kチャンネルの透過性は[K⁺]_oの減少に伴って増加した。この現象は微絨毛突起側のKコンダクタンスとして光刺激による網膜下腔のK⁺濃度減少を緩衝するうえで好都合である。
5. ウシRPEの内向き整流Kチャンネルの活性を維持するためには細胞内のATPが必須であることが判明した。
6. 2種類の外向き整流Kチャンネルは、膜電位依存性、時間依存性および阻害剤に対する感受性において互いに明らかに異なっていた。
7. 遅延型外向き整流Kチャンネルの開口閾値電位は約-40mVであり、RPEの静止Kコンダクタンスを構成しない。
8. 持続型外向き整流Kチャンネルは、RPEの静止膜電位において開いていることおよび高濃度の細胞外Ba²⁺により阻害されることから、RPEの基底側の静止Kコンダクタンスを構成すると思われる。
9. イオンチャンネルの機能に関する今後の研究においてウシRPEは良好なモデルとなり得る。

謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師河崎一夫教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始御指導を賜りましたアメリカ合衆国ミシガン大学眼科・生理学科のBret A. Hughes博士に心より深謝の意を表します。さらに、実験に際し御指導を賜りました金沢大学医学部附属病院眼科の瀬川安則講師に感謝します。

文 献

- 1) Capovilla M, Cervetto L, Torre V. Effects of changing external potassium and chloride concentrations on the photoresponses of *Bufo bufo* rods. *J Physiol (Lond)* 307: 529-551, 1980
- 2) Marmor MF. Mechanisms of normal retinal adhesion. *In* BM Glaser, RG Michaels (eds), *Retina*, p71-87, CV Mosby, St Louis, 1989
- 3) Lasansky A, DeFisch FW. Potential, current, and ionic fluxes across the isolated retinal pigment epithelium and choroid. *J Gen Physiol* 49: 913-924, 1966
- 4) Miller SS, Steinberg RH. Passive ionic properties of frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol* 36:337-372, 1977
- 5) Miller SS, Edelman JL. Active ion transport pathways in the bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol (Lond)* 424: 283-300, 1990
- 6) Joseph DP, Miller SS. Apical and basal membrane ion transport mechanisms in bovine retinal pigment epithelium. *J Physiol (Lond)* 435: 439-463, 1991
- 7) Quinn RH, Miller SS. Ion transport mechanisms in native human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 3513-3527, 1992
- 8) la Cour M, Lund-Andersen H, Zeuthen T. Potassium transport of the frog retinal pigment epithelium: autoregulation of potassium activity in the subretinal space. *J Physiol (Lond)* 375: 461-479, 1986
- 9) Immel J, Steinberg RH. Spatial buffering of K⁺ by the retinal pigment epithelium in frog. *J Neuro Sci* 6: 3197-3204, 1986
- 10) Hughes BA, Adorante JS, Miller SS, Lin H. Apical electrogenic NaHCO₃ cotransport. A mechanism for HCO₃ absorption across the retinal pigment epithelium. *J Gen Physiol* 94: 125-150, 1989
- 11) Bialek S, Miller SS. K⁺ and Cl⁻ transport mechanisms in bovine pigment epithelium that could modulate subretinal space volume and composition. *J Physiol (Lond)* 475: 401-417, 1994
- 12) Hughes BA, Steinberg RH. Voltage-dependent currents in isolated cells of the frog retinal pigment epithelium. *J Physiol (Lond)* 428: 273-297, 1990
- 13) Wen R, Lui GM, Steinberg RH. Whole-cell K⁺ currents in fresh and cultured cells of the human and monkey retinal pigment epithelium. *J Physiol (Lond)* 465: 121-147, 1993
- 14) Hughes BA, Takahira M, Segawa Y. An outwardly rectifying K⁺ current active near resting potential in human retinal pigment epithelial cells. *Am J Physiol* 269: C179-187, 1995
- 15) Brown DA, Adams PR. Muscarinic suppression of a novel voltage-sensitive K⁺ current in a vertebrate neuron. *Nature* 283: 673-676, 1980
- 16) Tao Q, Rafuse PE, Kelly ME. Potassium currents in cultured rabbit retinal pigment epithelial cells. *J Membr Biol* 141: 123-138, 1994
- 17) Botchkina LM, Matthews G. Chloride current activated by swelling in retinal pigment epithelium cells. *Am J Physiol* 265: C1037-1045, 1993
- 18) Ueda Y, Steinberg RH. Chloride currents in freshly isolated rat retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 58: 331-342, 1994
- 19) Corey DP, Stevens CF. Science and technology of patch-recording electrodes. *In* B Sakmann, E Neher (eds), *Single-Channel Recording*, p53-68, Plenum Press, New York, 1983
- 20) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 391: 85-100, 1981
- 21) Segawa Y, Hughes BA. Properties of the inwardly rectifying K⁺ conductance in the toad retinal pigment epithelium. *J Physiol (Lond)* 476: 41-53, 1994
- 22) DeCoursey TE. State-dependent inactivation of K⁺ currents

- in rat type II alveolar epithelial cells. *J Gen Physiol* 95: 617-646, 1990
- 23) ドーランド図説医学大辞典(ドーランド医学大辞典編集委員会編)第1版, 495頁, 923頁, 廣川書店, 東京, 1980
- 24) Harvey RD, TenEick RE. Voltage-dependent block of cardiac inward-rectifying potassium current by monovalent cations. *J Gen Physiol* 94: 349-361, 1989
- 25) Cooper K, Rae JL, Dewey J. Inwardly rectifying potassium current in mammalian lens epithelial cells. *Am J Physiol* 261: C115-123, 1991
- 26) Woodhull AM. Ionic blockage of sodium channels in nerve. *J Gen Physiol* 61: 687-708, 1973
- 27) Leech CA, Stanfield PR. Inward rectification in frog skeletal muscle fibers and its dependence on membrane potential and external potassium. *J Physiol (Lond)* 319: 295-309, 1981
- 28) Steinberg RH, Oakley BII, Niemeyer G. Light-evoked changes in K⁺ in retina of intact cat eye. *J Neurophysiol* 44: 897-921, 1980
- 29) Hughes BA, Shaikh A, Ahmad A. Effects of Ba²⁺ and Cs⁺ on apical membrane K⁺ conductance in toad retinal pigment epithelium. *Am J Physiol* 268: C1164-1172, 1995
- 30) Findlay I, Dunne MJ. ATP maintains ATP-inhibited K⁺ channels in an operational state. *Pflügers Arch* 407: 238-240, 1986
- 31) Wang W, Giebisch G. Dual effect of adenosine triphosphate on the apical small conductance K⁺ channel of the rat cortical collecting duct. *J Gen Physiol* 98: 35-61, 1991
- 32) Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305: 147-148, 1983
- 33) Cook DL, Hales CN. Intracellular ATP directly blocks K⁺ channels in pancreatic β -cells. *Nature* 311: 271-273, 1984
- 34) Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal* 2: 197-214, 1990
- 35) Ho K, Nichols, CG, Lederer WJ, Lytton J, Vassilev PM, Kanazirska MV, Hebert SC. Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362: 31-38, 1993
- 36) Takumi T, Ishii T, Horio Y, Morishige K, Takahashi N, Yamada M, Yamashita T, Kiyama H, Sohmiya K, Nakanishi S, Kurachi Y. A novel ATP-dependent inward rectifier potassium channel expressed predominantly in glial cells. *J Biol Chem* 270: 16339-16346, 1995
- 37) Cahalan MD, Chandy KG, DeCoursey TE, Gupta S. A voltage-gated potassium channel in human T lymphocytes. *J Physiol (Lond)* 358: 197-237, 1985
- 38) Ypey DL, Clapham DE. Development of a delayed outward-rectifying K⁺ conductance in cultured mouse peritoneal macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3083-3087, 1984
- 39) Hoshi T, Aldrich RW. Gating kinetics of four classes of voltage-dependent K⁺ channels in pheochromocytoma cells. *J Gen Physiol* 91: 107-131, 1988
- 40) Sims SM, Singer JJ, Walsh JV Jr. Antagonistic adrenergic-muscarinic regulation of M current in smooth muscle cells. *Science* 239: 190-193, 1988
- 41) Robbins J, Trouslard J, Marsh SJ, Brown DA. Kinetic and pharmacological properties of the M-current in rodent neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J Physiol (Lond)* 451: 159-185, 1992
- 42) Beech DJ, Barnes S. Characterization of a voltage-gated K⁺ channel that accelerates the rod response to dim light. *Neuron* 3: 573-581, 1989
- 43) Moore SD, Madamba SG, Joels M, Siggins GR. Somatostatin augments the M-current in hippocampal neurons. *Science* 239: 278-280, 1988
- 44) Griff ER, Shirao Y, Steinberg RH. Ba²⁺ unmasks K⁺ modulation of the Na⁺-K⁺ pump in the frog retinal pigment epithelium. *J Gen Physiol* 86: 853-876, 1985

Three Distinct Types of K Channels in Bovine Retinal Pigment Epithelium Masayuki Takahira, Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 — J. Jusen Med Soc., **106**, 677 — 698 (1997)

Key words potassium channel, retinal pigment epithelium, patch clamp, whole-cell current, bovine

Abstract

Whole-cell currents from freshly isolated retinal pigment epithelial (RPE) cells of the bovine were recorded by the patch clamp technique to identify K channels which comprise the resting K conductance of the RPE cells and to elucidate how these channels are regulated. The average resting membrane potential of the bovine RPE cells was -64 mV ($n=185$). An inwardly rectifying K current and two types of outwardly rectifying K currents were present in the bovine RPE cells. The inwardly rectifying K current was time-independent, and was selectively inhibited by extracellular Cs^+ . Conductance of this channel decreased as extracellular K^+ concentration increased. This behavior is uncommon among K channels, but would be useful for regulation of K^+ concentration in the subretinal space by the RPE. High concentration (2 to 4 mM) of ATP was required in the pipette to maintain the activity of the inward rectifier. The first outwardly rectifying K current was the delayed outward rectifier which was inactivated by prolonged membrane depolarization. This channel was active only when the membrane potential was above -40 mV, indicating that this channel does not serve as the resting K conductance. The delayed outward rectifier was selectively inhibited by extracellular tetraethylammonium⁺ (TEA^+). The second outwardly rectifying K current was the sustained outward rectifier which was not inactivated by prolonged membrane depolarization. This current was exhibited only in 24% of the total cells. This K channel had an opening threshold around -90 mV. High concentrations of Ba^{2+} blocked this channel, but TEA^+ did not. The inward rectifier and the sustained outward rectifier were active at the resting potential, revealing that these channels comprise the resting K conductances of the bovine RPE. Furthermore, on the basis of sensitivities to K channel blockers, the inward rectifier and the sustained outward rectifier could be located in the apical and basolateral sides of the RPE, respectively.