

総説

イノシトールリン脂質代謝産物による膜イオンチャンネルの制御

金沢大学医学部 神経情報研究施設 東田陽博
神経物性部門

A brief local application of bradykinin (BK) induced an immediate outward current, followed by a sustained inward current. BK produced an increase of inositol 1, 4, 5-trisphosphate and diacylglycerol. These two intermediates can duplicate the outward and inward current, suggesting that they play as intracellular second messengers.

Neuroblastoma / Bradykinin / K^+ currents

はじめに

神経伝達物質や変調物質は、それぞれの受容体を刺激しイオンチャンネルを開閉する事により、イオンの透過性を変え、膜興奮を生じたり変調したりする。それには主に4つの作用様式が考えられる(図1)。第1は、受容体分子内にイオンチャンネル機構(ポア)を備えているもので、すべての反応が自身の分子内で

完結する。第2は、心臓のムスカリン性アセチルコリンや脊髄後根細胞のアドレナリン性 α 受容体で示された例で、受容体がGTP結合タンパク質と結合しGTPタンパク質から(たぶん直接)内向き整流 K^+ チャンネルや Ca^{2+} チャンネルにシグナルを伝える。第3の様式は、多くの下等動物神経細胞で見られるように、アデニル酸シクラーゼを活性化した後、cAMP依存性プロテインキナーゼによりチャンネルタンパク質リン酸化を生じ、 K^+ 電流などの変調を行うやり方である。最後に、最近になって、受容体-GTP結合タンパク質複合体がホスホリパーゼCを活性化し生じたイノシトールリン脂質代謝産物であるイノシトール1, 4, 5-三リン酸(IP_3)とジアシルグリセロール(DG)がセカンドメッセンジャーとして働きチャンネルを制御するという様式が哺乳類腫瘍細胞でみつけた。ここではそれら4つの方法について順次解説する。

1. 受容体分子内 K^+ チャンネル

受容体分子のサブユニットは合成されたのち集合する。するとそれらの間にチャンネルのポアが形成される事が知られている。神経筋結合部位にあるニコチン性アセチルコリン受容体では、京都大学の沼らにより $\alpha\beta\gamma\delta$ の5つのサブユニットがカチオン($Na^+ - K^+$)チャンネルをつくる事が示された¹⁾。アセチルコリンによりチャンネルのゲートが開くと Na^+ が流入し、つづいて K^+ が流出し、いわゆる終板電位(eppやmepp)が記録される。この場合、リガンドの結合からチャンネルの開閉反応終了までの時間は約5-20ミリ秒と大変早い。

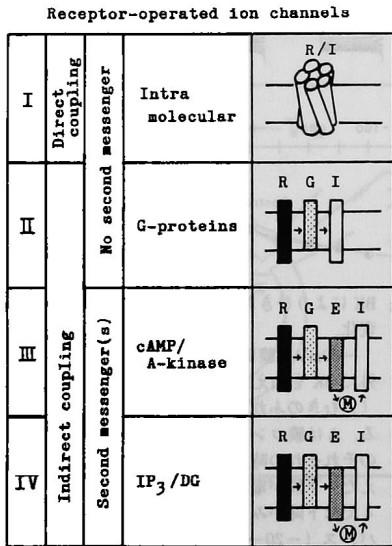


図1. 受容体からイオンチャンネルへの信号伝達様式

Modulation of Membrane Ion Channels by Inositol Polyphosphates

Haruhiro HIGASHIDA

Department of Biophysics, Neuroinformation Research Institute, Kanazawa University School of Medicine

2. GTP 結合タンパク質を介する制御

オピエト等の例外を除いてほとんどのホルモン受容体は、GTPase 活性を上昇させる事が知られている。多くの神経伝達物質受容体も例外ではない。伝達物質受容体が GTP タンパク質とカップルして K⁺ チャンネルを制御することがシアトルのワシントン大学薬理学教室の Pfaffinger らによりはじめて示された。GTP 結合タンパクと Ca²⁺ チャンネルとのカップリングについては、Tsien の総説に詳細がでている²⁾。

3. A キナーゼによる K⁺ チャンネル制御

Kandel 達は、アメフラシのえら引っ込み動作に関与するシナプスのプレ側に存在するセロトニン受容体が、cAMP 依存性プロテインキナーゼの活性により S とよばれる膜電位依存性の K⁺ チャンネルを閉じる事により、細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させシナプス伝達を促進させる事を発見している³⁾。おもしろい事に我々は、cAMP の産生が、この過程でエッセンシャルと思いがちであるが、活性化した A キナーゼを注入した細胞では、cAMP の上昇がなくても S 電流の減少が観られたという観察から、彼らは、より直接には、A キナーゼによるタンパク質リン酸化がイオンチャンネルのモジュレーションをひきおこしていると考えている。(たとえば文献16参照)

4. イノシトールリン脂質代謝産物による

1) K⁺ チャンネル制御

外的信号が引き起こす細胞膜リン脂質代謝産物である IP₃ と DG の産出が、それぞれ独立に細胞内の Ca²⁺ 濃度上昇とチャンネルタンパク質のリン酸化という反応を通じて、2つの別々の K⁺ チャンネルを開閉する例をここで述べる⁴⁾⁻⁷⁾。

よく知られているように、受容体刺激により膜リン脂質代謝回転が上昇し、膜の微量構成成分であるホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸のホスホジェステラーゼによる水解が生じる。そして、ジアシ

ルグリセリド (DG) とイノシトール 1, 4, 5-三リン酸 (IP₃) が産成される^{8),9)}。Berridge や Irvine により、IP₃ が細胞内の非ミトコンドリア性 Ca²⁺ 貯蔵部位から Ca²⁺ を遊離させることが発見された⁹⁾。また、もう一つの反応生成物であるジアシルグリセロール (DG) は、神戸大学の高井や西塚らにより C キナーゼを活性化することが示された⁸⁾。それぞれは間接的に細胞内でセカンドメッセンジャーとして働く。即ち細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇と蛋白質のリン酸化を伴い細胞反応を誘発する。この情報伝達変換機構は、いろいろの刺激に対して種々の細胞で生じる(従って、かなりユニバーサルな)反応である。神経細胞におけるこれらセカンドメッセンジャーとしての作用は、ニューロプラストーマ・グリオーマ雑種 NG108-15細胞⁸⁾の持つブラジキニン受容体反応で、より詳細に研究された

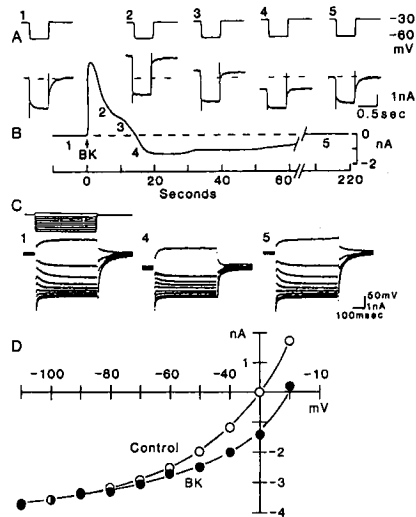


図2. BKによりひきおこされる NG108-15細胞の膜電流変化。

-30mVに膜固定し、Bの矢印のところで細胞外にBKを加えた後の膜電流の変化。外むき電流(上むきのふれ)につづいて内向電流が生じている。Aは膜コンダクタンスの変化をみるためにBのそれぞれの時点でステップパルス(上段)を加えた。下段が電流。2ではコンダクタンスの上昇4では下降がみられる。C A1と同様のステップパルス(-20→-110mVまで10mVづつ)による電流群。1でみられる下むきへの曲線(インワードリラクゼーション、すなわちM電流)が4では減少している。D BKアプリケーション前(control)と後内向き電流発生時にとったIV(電圧・電流)曲線。脱分極によりコンダクタンスが増加する傾向(アウトワードレクチフィケーション)がBKにより小さくなっている。詳細は文献15の図6を参照。

* マウスのニューロプラストーマ C1300細胞より天野ら (Amano, Hamprecht & Nerenberg, unpublished data) によりクローン化された N18細胞がつけられた。これらの HGPRT 欠損株細胞 (N18TG-2) とラットグリオーマ C6細胞の TK 欠損株 C6Bu-1細胞をセンダイウイルスによる融合により作られた雑種細胞である。染色体のデータ等は Cancer Gen. Cytogenet 5, 51-62 (1982) の Kano-Tanaka の論文参照。

ので、以後著者らによるその研究を中心に述べる。

2) ブラジキニンによる膜電流変化

ブラジキニン投与により NG108-15細胞の膜電位は最初過分極を生じ続いて脱分極する。過分極中には Na^+ や Ca^{2+} スパイクは完全に抑制され(興奮性の低下), 脱分極中にはスパイク頻度が上昇(興奮性上昇)する。この二相性変化の原因が膜電位固定法による電流やシングルチャンネル電流測定により明らかになった。過分極は, Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流の増加, 脱分極は膜電位依存性 M 電流の減少によることがわかった(図2)。

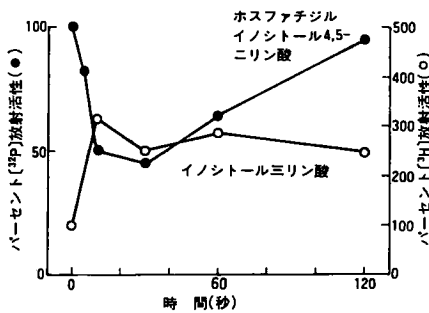


図3. BKによるホスファチジル, イノシトール4, 5ニリン酸 (PIP_2) の減少と IP_3 の産成.

他方, 生化学的測定で, この細胞ではブラジキニン刺激直後, 細胞膜リン脂質のうち, ホスファチジルイノシトール4, 5-ニリン酸画分中の ^{32}P 放射活性が減少する事がわかっている(図3). そしてその水解産物である IP_3 が増加する。この産生された IP_3 により細胞内 Ca^{2+} 濃度が, 300nM 程度に上昇する。この上昇が Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルを開く。この事をパッチクランプ法によるシングル K^+ チャンネル記録法により確認した。

3) Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルと IP_3

ニューロプラストーマ細胞には, 少なくとも3種類以上の Ca^{2+} 依存性 K^+ チャンネルが存在している事がわかった。それらはそれぞれ100, 40, 10pS のユニットコンダクタンスを持っていた。パッチ野以外の細胞表面に存在するブラジキニン受容体を刺激して, パッチ内の40pS K^+ チャンネルの活性が記録できた¹⁰⁾。この事は, ブラジキニン受容体がセカントメッセンジャーを使用してチャンネルを制御していることを示唆している。電流測定で, 実証したと同様の条件を使用し, 細胞内に刺入したガラス管よりイオン通電により IP_3 注入を行った。その直後に, 40pS のチャンネルの活性は上昇した(図4)。開くチャンネルの数及び開放確率の両方が上昇した。以上の結果を総合すると, 神経腫瘍由来の NG108-15細胞では IP_3 の注入が

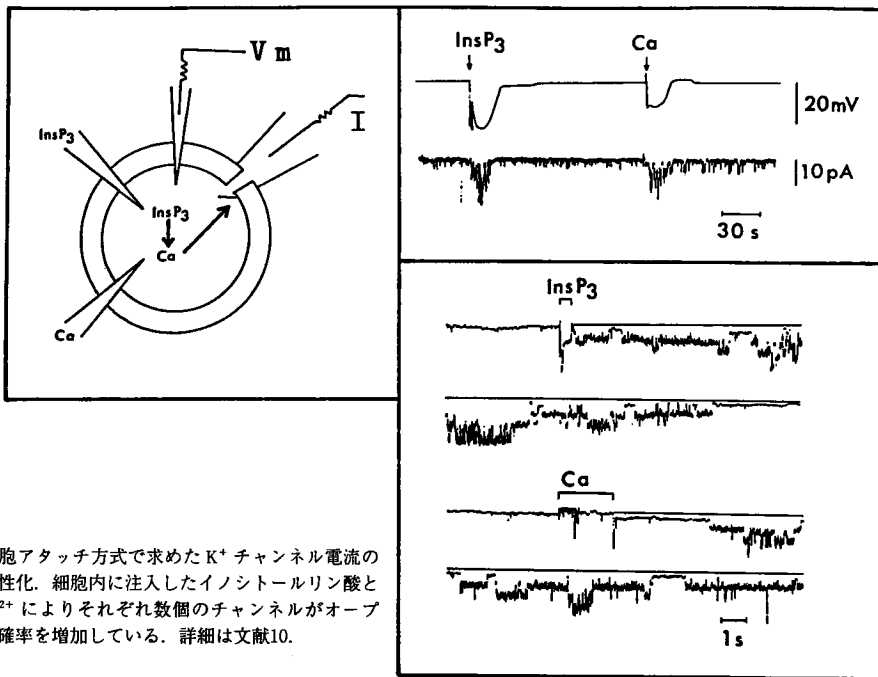


図4. 細胞アタッチ方式で求めた K^+ チャンネル電流の活性化。細胞内に注入したイノシトールリン酸と Ca^{2+} によりそれぞれ数個のチャンネルがオープン確率を増加している。詳細は文献10.

過分極（電流測定では外向き電流）を生じ、それは細胞内 Ca^{2+} 注入で誘発される電流と同じ性質を持っていた。イノシトールの3位の位置に、さらにリン酸化がついたイノシトール、1, 3, 4, 5 四リン酸 (IP_4) は細胞内に Ca^{2+} を遊離させる能力は全くなく、従って神経腫瘍細胞内に注入しても膜電位（流）には何の変化も起きなかった¹¹⁾。

Irvine ら²⁰⁾ は神経細胞以外では細胞外からの Ca^{2+} の流入に IP_4 が寄与しているとし、膜電位に依存しない新しいタイプの Ca^{2+} チャンネルを想定している。 IP_4 の5位のリン酸がはずれて生じた IP_3 (1, 3, 4) は、その注入によりわずか (IP_3 (1, 3, 4) の約 $1/60$) の Ca^{2+} が流出することが知られており、実際 Ca^{2+} 依存性 K^+ 電流の活性化（過分極）も殆ど観察されなかった。

5. M 電流

IP_3 と同時に産生する DG は、プロテインキナーゼ

C (PK-C) を活性化する。シナプス機能に対する PK-C の作用について長い間明快な答えが得られなかった。Snyder 研究室の Baraban らにより、腫瘍細胞よりも炎症作用が強いホルボールジブチレート (PDBu) やジアセテート (PDAc) が、哺乳類神経細胞の活動電位に効果を持つ事が見い出され、その役割がはっきりしてきた。神経組織での PK-C の K^+ チャンネルに対する作用としては、①ラット脳海馬領域の大型錘体細胞では、活動電位発生後に生じる二つの過分極電流 (I_{MHP}) のうち、遅いコンポーネント（従って、アパミン感受性の Ca^{2+} 依存性チャンネル K^+ チャンネル）を抑制し、その結果、膜興奮性を高める事が示された¹⁷⁾。②PDBu はウミウシ視細胞の光に対する定常脱分極を増加し、これは、PK-C を細胞内に注入した時の効果と一致していた。この細胞ではトランジェント外向き電流（即ち A 電流）も増加した¹⁸⁾。③下垂体腫瘍細胞では、PDBu や注入した PK-C により A 電流は抑制され、その結果、膜興奮性が增大す

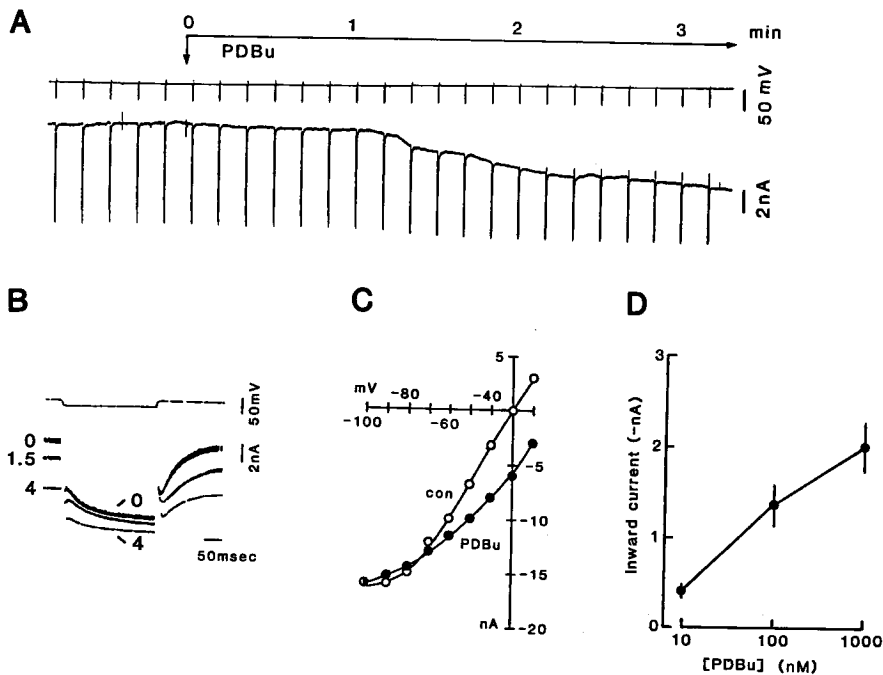


図5. ホルボールジブチレートによる内向き電流の発生と M 電流の抑制。

A 細胞外かん流液に $1 \mu M$ のホルボールエステルを加えると $-40mV$ に膜固定した NG108-15 の膜が徐々に内むき電流を生じるようになる（下段、下むきへのシフト）。B $-40mV$ から $-60mV$ にステップをかけた時の膜電流がコントロール（0分）、ホルボールエステル処理後1.5, 4分はどう変化するか見た図。コンダクタンス（刺激前から終わりまでの電流のふれ）と M 電流成分（下方へのふれ）が減少する。C ホルボールエステル添加前（con）と後（PDBu）の $I-V$ 曲線。右上方への変化（アウトワードレクティフィケーション、M 電流）がゆるやかになっている。D 各ホルボールエステル濃度かん流時の誘発された内むき電流。詳細は文献7。

ることが示された¹⁹⁾。一方、NG108-15細胞では、ホルボールジブチレート²⁰⁾を細胞外に投与し、1~2分以内に内向き電流が記録できた事からDGの作用による事がわかった(図5)。期待通り、ホルボールジブチレートによる内向き流の時、ブラジキニンによつたのと同様な内向き電流がみられ、同時に、M電流²¹⁾の抑制がみられた。従つて、ホルボールジブチレートによる内向き電流がM電流の減少に起因していることは明確である。シングルMチャンネルの記録はまだされていない。ノイズアナリシスから、それが1.5~3 pSの大きさである事が最近相次いで確認された。

おわりに

神経のモデル細胞である培養NG108-15細胞で、PI反応を仲介して生じるイオンチャンネル活動の変化を述べた¹³⁾(図6)。IP₃による過分極反応、即ち、Ca²⁺依存性K⁺チャンネルの活性化は多くの神経細胞にも見られるはずであるが、IP₃により増加するCa²⁺が開かれるチャンネルがないと生じない。PDBuで閉じたMチャンネルも、海馬の神経細胞では効果がない事が知られている。従つて、ここで述べた信号伝達様式がすべての部位のすべての受容体に当てはまるものでもないかもしれない。しかし、これはPI代謝を生化学的に測定した基礎に立って、リン脂質代謝産物によるイオンチャンネル制御の細部がわかっている数少ない例である。この系をそっくり使ってFukudaらはク

ローン化されたムスカリン性アセチルコリン受容体遺伝子のサブタイプの性質を同定した¹⁴⁾。今後このような遺伝子工学的手法を用いた表現実験で、神経機能を有した培養細胞は、機能を持たないファイブプロラストのような細胞と同様、或はそれ以上に利用価値があると思われる。

文 献

- 1) Mishina, M., Kurosaki, T., Tobimatsu, T., Morimoto, Y., Noda, M., Yamamoto, T., Terao, M., Lindstrom, J., Takahashi, T., Kuno, M. and Numa, S. (1984) *Nature* 307, 604-608.
- 2) Tsien, R. W., D. Lipscombe, D. V. Madison, K. R. Bley and A. P. Bley and A. P. Fox. (1988) *Trends Neurosci.* 11, 431-438.
- 3) Goelet, P., Castellucci, V. F., Schacher, S., Kandel, E. R. (1986) *Nature* 322, 419-422.
- 4) 東田陽博(1987)代謝, 24(11), 1017-1023.
- 5) 東田陽博(1987)細胞工学, 別冊3, 8-10.
- 6) Higashida, H., Brown, D. A. (1986) *Nature* 323, 333-335.
- 7) Brown, D. A., Higashida, H. (1988) *J. Physiol.* 397, 185-207.
- 8) Nishizuka, Y. (1984) *Nature* 308, 693-698.
- 9) Berridge, M. J., Irvine, R. F. (1984) *Nature* 312, 315-321.
- 10) Higashida, H., Brown, D. A. (1988) *FEBS Letters* 238 (2), 395-400.
- 11) Higashida, H., Brown, D. A. (1986) *FEBS Letters* 208, 283-286.
- 12) Brown, D. A. (1988) *Trend Neurosci.* 11 (11), 264-299.
- 13) Miller, R. J. (1988) *Trend Neurosci.* 11 (10), 415-469.
- 14) Fukuda, K., Higashida, H., Kubo, T., Maeda, A., Akiba, I., Bujo, H., Mishina, M. & Numa, S. (1988) *Nature* 335, 355-358.
- 15) Brown, D. A., Higashida, H. (1988) *J. Physiol.* 397, 167-184.
- 16) Shuster, M. J., Camardo, J. S., Siegelbaum, S. A. & Kandel, E. R. (1985) *Nature* 313, 392-395.
- 17) Malenka, R. C., Madison, D. V., Andrade, R. & Nicoll, R. A. (1986) *J. Neurosci.* 6, 475-480.
- 18) Farley, J. & Auerbach, S. (1986) *Nature* 319, 220-223.
- 19) Barker, J. F., Dufy, B., Harrington, J. W., Harrison, N. L., MacDermott, A. B., MacDonald, J. F., Murphy, D. C., Owen, D. G. & Vicini, S. (1987) *Ann N. Y. Acad. Sci.* 494, 1-16.
- 20) Irvine, R. F. & Moory, R. (1986) *Biochem. J.* 240, 917-920.

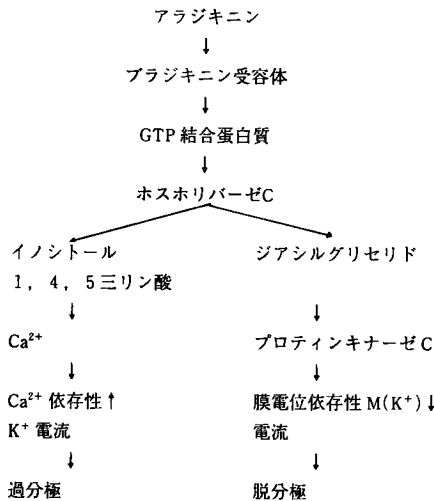


図6. ブラジキニンからKイオンチャンネル制御にいたる細胞内信号伝達経路。

ひがしだ はるひろ



昭和46年、岐阜大医学部卒業、50年名大大学院修了、医学博士。
同年、名大環境医研助手、55年金大がん研薬理部講師、63年現職。
この間、米国 NIH、M. Nirenberg 博士の遺伝生化学教室に約6年
留学。ニューロプラストーマ雑種細胞による研究を行っている。趣味、
スバルレオーネによる雪道のドライブ

☎ 0762-62-8151 内線2280

S A N S A K U
さんさく

“Multichannel Time-Resolved Light Scattering from Ordered Colloidal Suspensions” (1988) H. O. Moser, O. Fromhein, F. Herrmann, H. Versmold *J. Phys. Chem.*, **92**, 6723-6725.

光散乱法はバイオコロイド系の構造等を調べる有力な手段であるが、その動的な性質(経時変化)を調べようとすると、角度スキャンが時間的ネックになっていた。迅速スキャン方式や写真フィルム法などが試みられてきたが、時間分解能は十分とは言えなかった。本論文では、光ファイバーを用いた Multichannel 光散乱装置の試作と応用例を紹介している。角度分解能は 1° 、時間分解能は何と10msec のオーダーであり、モデル系であるラテックス分散系の構造因子の経時変化がきれいに得られている。この装置は、溶液、分散液の構造因子の経時変化はもちろん、会合反応の速度論、フラクタル的性質の時間的スケールング、さらには、バイオコロイドのクラスター形成現象など応用範囲は広く、注目に値する。

(H. M.)