

『G蛋白質によるカリウム・チャネルの開閉調節』

特集 プロジェクト研究

堀尾嘉幸*, 倉智嘉久**

The regulation of K⁺ channel activity by G protein

Key Words : K⁺ channel, G protein, patch clamp

はじめに

本研究について述べる前にバックグラウンドをお話したいと思います。

心臓の鼓動の調節

人間の心臓は1分間に約60回の規則的な収縮と弛緩をくり返しています。この心臓のポンプ作用によって血液は心臓から全身に送り出され循環します。心臓が1回収縮しそして弛緩することによって、血液の脈流が生まれ、私たちは脈として、手首や首筋でこの血液の脈流を感じることができます。ちなみに、心臓が収縮して血液を駆出するときの血管内圧が最大血圧、心臓が弛緩する際の圧が最小血圧です。走ったり、おおぜいの人の前に立って話をしたり、また、ちょっと恥ずかしい思いをしたりすると脈拍が速くなる経験をしたことはきっとどの人にもある

ことでしょう。なかには心臓が口から飛び出るような思いをされたかたもあるかもしれません。また、逆に、リラックスしているときには心臓の鼓動の数が少なくなっていることにお気づきでしょうか。恐い夢を見たような場合は例外ですが、睡眠時にはだいたい脈拍は遅く緩やかになっています。このように心臓拍動の数(心拍数)は大きく変化します。また、心筋の収縮力も変化します。心拍数や心筋収縮力の変化は主には交感神経と副交感神経という神経の活動によってコントロールされています。心拍が速くなるときに活躍するのが交感神経、逆に心拍が遅くなるときに働く神経は副交感神経とよばれ、どちらの神経も脳によって活動がコントロールされています。蛇足ですがこれらの神経の活動は自分の意志では通常コントロールできないことから自律神経と呼ばれることがあります。心拍が速くなる場合、交感神経や副腎からはノルアドレナリンやアドレナリンと呼ばれる神経伝達物質が放出されて、それらの物質が心筋の細胞膜上にある受容体とよばれる受け捕り手に結合し、その結果、細胞内でサイクリックAMPと呼ばれる物質が産生されて心拍数が増加します。ここでノルアドレナリンやアドレナリンという物質は生体内で心臓の活性化を起こす一種のホルモンで、いずれもアミノ酸のチロシンから体内で合成されるものです。



*Yoshiyuki HORIO
1955年10月9日生
1985年大阪大学大学院医学研究科卒業
現在、大阪大学・医学部情報薬理学科
(旧 薬理学第二教室)、助教授、医学博士、薬理学・生化学
TEL 06-6879-3512
FAX 06-6879-3519
E-Mail horio@pharma2.med.
osaka-u.ac.jp



**Yoshihisa KURACHI
1953年9月23日生
1978年東京大学医学部卒業
現在、大阪大学医学部情報薬理学科
(旧 薬理学第二教室)、教授、医学博士、薬理学
TEL 06-6879-3510
FAX 06-6879-3519
E-Mail ykurachi@pharma2.med.
osaka-u.ac.jp

徐脈のメカニズム

私達は心拍を遅くするメカニズムについて研究しています。心拍が遅くなるときには副交感神経の末端からアセチルコリンとよばれる神経伝達物質が放出されます。このアセチルコリンは心筋細胞膜上にあるアセチルコリン受容体という受けとり手に結合してその作用が発揮されます。ちなみにアセチルコ

リンといってもあまりピンとこないかもしれませんが、あのサリンが関係しているといえ少しは興味がわいてくるかもしれません。アセチルコリンがその受容体に結合した後、アセチルコリンは分解されて作用がなくなるのですが、サリンはこのアセチルコリンの分解反応を止めてしまいます。つまりサリンはアセチルコリンの分解を妨げ、心臓をはじめ筋肉、脳などアセチルコリンが作用している数多くの領域に異常をおこします。呼吸筋は抑制を受けて呼吸は停止してしまいます。サリンがもともと兵器として開発された理由がおわかりでしょう。話を元にもどして、アセチルコリンが受容体に結合したあと、心臓の拍動がどのようにして遅くなるのか？先ほど少し述べましたが、交感神経による心拍数増加が細胞内のサイクリックAMP量が増えることによって1960年代には既に知られていました。一方、徐脈のメカニズムは1980年代に入るまでずっと不明のままでした。これは今振り返ってみますとその現象を開明する技術が当時なかったからと考えられます。この技術はパッチクランプ法とよばれている技術です。1976年にErwin NeherとSakmannによって開発されて以来、パッチクランプ法は急速に各種の細胞のチャンネル分子の研究に応用されてきました。この功績によってNeherとSakmannは1991年のノーベル医学・生理学賞に輝きました。(図1)

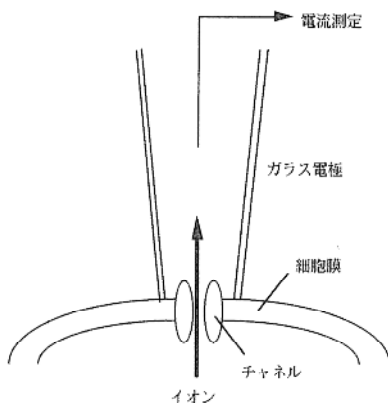


図1 パッチクランプ法

チャンネルとは？

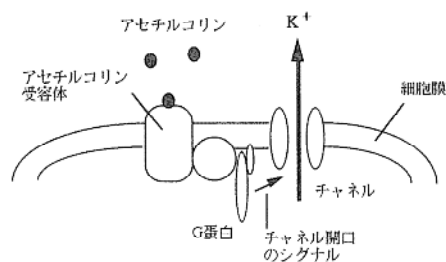
ここで、ちょっと注釈を入れますと、細胞は細胞膜と呼ばれる脂質二重膜によって外界と遮断されています。カリウムやナトリウムなどのイオンはこの脂質二重膜を透過できず、チャンネルやポンプとよば

れる膜蛋白質を使って細胞の中に入ったり、また、細胞の外に出たりします。これらの膜蛋白質、特にチャンネルはその研究法が無く、また、膜に埋もれているためほとんど研究がおこなわれていませんでした(膜にうずもれていると膜がじゃまになって扱い難くなってしまいます)。チャンネルはイオンを透過させる機能を持った蛋白質で膜に存在しています。それ自体には積極的にイオンを運ぶ機能はありません。ちなみに、エネルギー源としてATPを使って能動的にイオンを運ぶ膜蛋白質はポンプと呼ばれています。チャンネルは受動的にイオンを透過させますので、イオンの動く方向は原則としてチャンネル内外の濃度差と電位差によって決まります。多くのイオンは細胞の内外でその濃度が違うことは随分以前からわかっていました。細胞外液のカリウムイオン濃度は約5mM存在しています。血液も細胞外液の1つですから血液中のカリウム濃度も約5mMです。ところが細胞内にはカリウムイオンは約140mMも存在しています。ここで使っているmMは濃度の単位で、例えば、KCl(塩化カリウム)の溶液を考えますと、1リットル中に約0.4g解けている溶液が5mMの濃度となります。反対にナトリウムイオンは細胞外のほうが格段に濃度が高くなっています。また、多くの細胞は細胞内外のイオンの濃度のアンバランスによって、電位を持っています。例えば神経細胞では細胞内が約-60~70mVのマイナスに帯電しています。カリウムイオンでいいますと濃度差では外方向に、電位差では細胞内の方向に向かって流れようとしています。実際にはイオンの流れる方向はこの総和で決定されます。ただし、弁のようなものがついていて、なにかのシグナル、たとえば、アセチルコリンなどの神経伝達物質のシグナルがきて初めて開いて、そのシグナルがなくなるとまた閉じてしまうものや、逆流防止弁様のものを持って一方しかイオンを透過させないチャンネルもあります。

さて、パッチクランプ法登場以前はチャンネルの研究は研究以前の状態といっても過言ではありませんでした。チャンネルという概念自体も研究者にそれほど浸透していなかったフシが見受けられます。ところが、パッチクランプ法によってこれまで全く不明だったイオンの流れが現実の研究対象となって、細胞のイオンのやりとりがチャンネルを通じておこなわれていることが明かとなってきたのです。研究の進

展に伴ってチャネルは一種類ではなく、各種のイオンに特異性を持ったチャネル、即ち、カルシウムにはカルシウムチャネル、カリウムにはカリウムチャネル、ナトリウムにはナトリウムチャネルがあり、さらに、各々にはまた、数多くの種類があることがわかってきました。また、複数の種類のイオンを透過させることができるチャネルもあります。

パッチクランプの技術によって心筋に対するアセチルコリンの作用がカリウムチャネルと呼ばれる心筋細胞膜にある蛋白質を活性化して開口させることにあることが判明しました。このカリウムチャネルが開くと細胞内にある陽イオンであるカリウムイオンが細胞外に移動して、細胞の興奮が抑えられます。その後の精力的な研究によって、アセチルコリンによるカリウムチャネル開口のメカニズムがさらに詳しくわかってきました。アセチルコリンが心筋細胞膜にある受容体に結合するとアセチルコリン受容体に結合しているG蛋白質(三量体GTP結合蛋白質)とよばれるシグナルの仲立ちおこなう蛋白質が活性化されます。次に、この活性化されたG蛋白がカリウムチャネルを開きます。この結果、細胞内のカリウムイオンが細胞外に流出します。プラス電荷を持ったイオンが細胞の外に移行することから、細胞内がよりマイナスの電荷を帯びることになり、細胞の興奮性が抑制されます。ここで、細胞の興奮といのは心筋細胞でいうと心筋細胞の収縮となります。即ち、心臓の収縮が抑制され、また、心拍数が減少することになります。(図2)



G蛋白質制御性カリウムチャネルはアセチルコリン等の刺激下、G蛋白を介したシグナルによって開き細胞の興奮を抑制する。

図2 G蛋白質制御性カリウムチャネル

G蛋白質抑制性カリウムチャネル

最近の分子生物学的研究の進展によつてチャネルの分子構造が明かとなりました。この心臓の機能を

抑制するカリウムチャネルは膜を貫通する領域を2つ持った501個のアミノ酸からなるKir3.1というチャネル分子(KirはInwardly rectifying potassium (K) channelからとった略称.)とやはり膜貫通領域を2つ持つ439個のアミノ酸残基からなるKir3.4というチャネル分子が、それぞれ2分子の合計4つの分子が集まって構成されていることが明らかとなりました。3.1とか3.4とか少し変な名前の付け方ですが、3.1は第3群の1番目、3.4は第3群の4番目といった意味あいです。カリウムチャネルは非常にたくさんの種類があるため、このような名前の付け方をされているわけです。さきほども少しふれましたが、この心臓のカリウムチャネルはアセチルコリンのシグナルによって三量体GTP結合蛋白質の活性化を介して開口します。このチャネルがG蛋白質抑制性カリウムチャネルと呼ばれる所以です。心臓ではKir3.1とKir3.4で構成されていますが、他の臓器でもこのG蛋白質抑制性カリウムチャネルが活躍しており、この場合は別のチャネルサブユニット(Kir3.2やKir3.3)から構成されたチャネルも働いています。現在、G蛋白質抑制性カリウムチャネルには4種類あることがわかっており、これらの4種類がいろいろ組み合わせで4つ集まって、1つのチャネルを作っています。このように種類はいろいろあるのですが、機能についてはいずれも一言でいうと細胞興奮の抑制にあるといえます。

つまり私達は細胞興奮の抑制の機構に焦点をあてて研究しています。抑制は興奮があってはじめて意義のあるものになりますから、抑制というとなにか二次的なものに思われるかもしれませんが、しかし実は抑制の機構は高等の証しのようなものなのです。例えば、お酒を飲んだとき、気分が昂揚します。これはアルコールの作用によって脳の抑制機構が興奮の機構より先に鈍麻、麻痺しておけると考えると理解しやすい現象です。アルコールをさらに飲み続けてこの状態を通り過ぎますと、興奮の機構もアルコールにやられて最後には意識を失ってしまいます。さて、問題は適度のアルコールでおこなうことができる気分昂揚の時です。あなたにはこの時、理性が働いているのでしょうか？理論整然とした議論ができるのでしょうか？複雑な考証をおこなえるのでしょうか？答えは100人に聞いて100人がノーでしょう。抑制は人を人たるものにしていく源泉という言いすぎでしょうか？

私たちのプロジェクト

脳の抑制性シグナルの解明

さて、G蛋白質制御性カリウムチャンネルが心臓機能の抑制に大切な役割を果たしていることを述べました。実はこのチャンネルは心臓ばかりではなく中枢神経系、膵臓ランゲルハンス島、精巣などの臓器に発現し、各の場所においても重要な機能を果たしています。例えば、脳ではいろいろの神経細胞に発現しており、発現している神経細胞の活動を抑制する機能を担っています。一例をあげますと、脳に黒質という領域があります。黒質という名前は脳をとりだしてみるとその領域だけ少し黒い色がついていることによっています。蛇足ですが、脳には青斑核とよばれるやや青みがかかった領域も存在しています。それはさておき、この黒質にはドーパミンという神経伝達物質をだすドーパミンニューロンが集まっています。このドーパミンニューロンにはG蛋白質制御性カリウムチャンネルのKir3.2が機能しています。Kir3.2はドーパミンニューロンのデンドライトのポストシナプス部位に局在しています。さらに、この局在はKir3.2チャンネルが足場となる特定の蛋白質(scaffold protein)に結合することによっておきていることが私達の研究によりわかりました。scaffold proteinには関連のある蛋白同士を結合させるという機能が提唱されています。Kir3.2に関連のある蛋白質がscaffold proteinにくっついて、Kir3.2とともに機能しているのではないかと、また、この蛋白質がKir3.2の機能を調節しているのではないかと考えて研究をすすめています。

Kir3.2チャンネルの機能はドーパミンニューロンの活動を抑制することにあると考えられます。パーキンソン病という脳の病気は黒質のドーパミンニューロンが変性してしまう病気です。変性によって錐体外路症状とよばれる症状が出現します。たとえば、動作をおこすことが難しくなり、歩行時に足を踏み出すことが困難になったり、また、逆に動作を止める指令がうまく働かなくなります。つまり、歩いて止まれないといったことが起きます。これには突進現象という名前がついています。丸薬製造運動などという名前がついている特徴ある指の動きをくりかえしたり、また、手指の震えがでたりと、患者さんにとっては大変な苦痛となる症状が出現し、徐々に進行する病気です。その原因については現在もほ

とんどのものが不明ですが、ひとつヒントとなる遺伝性疾患のマウスがいます。それはウィーバマウスというマウスです。このマウス生後1ヶ月頃からパーキンソン病とよく似た症状を呈します。このマウスの脳を調べますと黒質のドーパミンニューロンが変性しています。このマウスの原因遺伝子が最近になってKir3.2であることがわかりました。遺伝子の点突然変異(GがAに変わる)のためにウィーバマウスではKir3.2の1箇所のアミノ酸がグリシンからセリンに変わってしまっています。このアミノ酸はちょうどチャンネルの穴を形成するところにあたり、そのため、この変異チャンネルではカリウムイオン以外にナトリウムイオンも透過させてしまいます。また、G蛋白質制御性がなくなっています。ヒトのパーキンソン病の多くは中年以降老年になっておきやすいため、Kir3.2がヒトでもその原因となっている可能性は高くありません。しかし、なぜこのようなチャンネルの変異がドーパミンニューロンの死につながるのかを解明することは、パーキンソン病のメカニズムの一端を明かす手がかりとなるのではないかと考えています。また、このKir3.2の変異によってなぜG蛋白質制御性がなくなるかを調べることは、G蛋白質がどのようにしてこのチャンネルを制御しているかを解く手がかりとなると考えられます。

精巣のチャンネルは何をしているのか？

ウィーバマウスのオスは精巣の発育が悪く無精子症を呈します。精巣にもG蛋白質制御性カリウムチャンネルのKir3.2が発現しています。ウィーバマウスの無精子症も異常Kir3.2が精子の元になる細胞に発現していることによっていると考えられます。Kir3.2がなぜこのような細胞に発現しているのかはわかっていません。精巣ではどのような生理的機能を担っているのか、また、なぜ異常Kir3.2が発現すると細胞が死んでしまうのかを研究しています。

膵臓ランゲルハンス島のチャンネルとホルモン分泌
膵臓ランゲルハンス島はインスリンやグルカゴンといったホルモンを分泌する臓器です。膵臓の大部分は消化酵素を膵管から十二指腸へ送りだす腺細胞と呼ばれる細胞からできています。その組織の中に島のようにして点在しているのがランゲルハンス島です。みなさん御存知の糖尿病という病気は、このランゲルハンス島から分泌されるインスリンの量が

不足したり、インスリンの効きが悪くなったりするためにおこります。糖尿病の治療薬にはランゲルハンス島インスリン分泌細胞に働き、インスリンを分泌させる薬があり、実際よく使われています。G蛋白質制御性カリウムチャンネルはこのランゲルハンス島にたくさん発現しています。ランゲルハンス島から分泌されるホルモンの分泌は別のホルモン、例えば、ソマトスタチンなどによって抑制されます。実はこのホルモン分泌の抑制機構にG蛋白質制御性カリウムチャンネルが関与していることがわかってきました。このホルモン分泌の抑制機構を研究することによって、ランゲルハンス島からのホルモン分泌の制御機構、特に抑制機構を明かとし、糖尿病などの病態の理解を深めるとともにその治療に役立てればと考えています。

チャンネル分子の理解にむけて

上にあげてきました実際の生体でのG蛋白質制御性カリウムチャンネルの分布、機能や生理的役割りを解明し、関連する病態を明らかとする研究方向に加えて、チャンネル分子がどのようにしてG蛋白質のシグナルによって開くかという、どちらかという生物物理的な研究もあわせておこなっています。アセチルコリンなどの神経伝達物質の刺激によって $\alpha\beta\gamma$ の3量体G蛋白質が α と $\beta\gamma$ に解離します。この $\beta\gamma$ がG蛋白質制御性カリウムチャンネルに結合することによってチャンネルが開きます。それでは

$\beta\gamma$ はどのようにしてチャンネルを開くのか？逆に、結合していない場合はなぜチャンネルが閉じているのか？この疑問を明らかにするために、私達は一分子のチャンネルの動態を視覚的に捕らえようと試みています。チャンネルとG蛋白質の相互作用を見るために、チャンネルやG蛋白質分子に蛍光物質をつけて、蛍光顕微鏡下で観察するという方法を試みています。融合蛋白質により蛍光を発するG蛋白質やカリウムチャンネルも使っています。これには green fluorescent protein(GFP)の仲間を用いています。蛍光を発するクラゲを水族館で見られた方もおられるのではないかと思います。ある種のクラゲが持つ蛋白質であるGFPには緑色の蛍光を出す性質があります。現在ではこのGFPを改変して異なる励起波長と異なる蛍光を出すものが開発されています。そこで、互いに異なる蛍光蛋白質や蛍光物質でG蛋白質とチャンネルに別々ラベルを入れて、両分子の結合と解離の状態や、結合によるチャンネル分子の動きを調べようとしています。

おわりに

これまで述べてきましたように私達はチャンネル、その中でもG蛋白質制御性カリウムチャンネルの研究からこれまでわかっていなかった現象を分子のレベルで理解し、さらに、その研究のなかから疾病の診断や治療に結びつくものがでてくることを期待しています。