細胞内 ATP とイオンチャンネル

柴崎 享* 野間昭典* 堀江 稔* 加計正文**

Hypoxia や虚血によってエネルギー代謝が抑制されると、心室筋の活動電位持続時間は短縮する。この機序をイオン電流の変化に基づいて解明するため、パッチクランプ用電極を用い、モルモット単一心室筋細胞の細胞内灌流を、各種 ATP 濃度でおこなった。ATP 濃度が減少すると K^+ 電流が増加し、 Ca^{2+} 電流は減少した。この K^+ 電流は、細胞内 ATP 濃度の減少によって活性化するが、膜電位変化によっては活性化・不活性化を受けない特殊なグループに属する K チャンネルを通して流れることが単一チャンネル記録法であきらかになった。単位電流量は他の K チャンネルに比して大きく、チャンネル数は 1 個の細胞に約 3,000 存在することが推定された。

プラトー相の短縮はこの ATP 依存性 K チャンネルの活性化によっており、 Ca 電流の減少がこの短縮をさらに促進すると考えられた。

Hypoxia, 虚血, あるいは代謝阻害剤によって心筋のエネルギー代謝が抑制されると、活動電位持続時間が著明に短縮することは、すでに 30 年前より指摘されていた¹⁾。McDonald ら (1973)²⁾ によってこの代謝障害時のプラトー相短縮は細胞内 ATP 濃度の低下と関係していることが、はじめてあきらかにされた。谷口ら (1983)³⁾ は、代謝阻害剤 (CN^-) で単一心室筋細胞の活動電位が短縮する時、同時にプラトー電位での外向き K^+ 電流が増加すること、細胞内に ATP を注入すると、この K^+ 電流は抑制され活動電位持続時間に回復がみられることを報告した。

以下、本稿では細胞内灌流法及び単一チャンネル電流記録法によって、細胞内 ATP 濃度の変化に際し、みられるイオン電流の変化とプラトー相短縮の関係をイオンチャンネルレベルで解析する。

I. 方 法

コラゲナーゼ処理して得られたモルモット単一心室筋細胞を用い、細胞全体を膜電位固定 (whole cell clamp) した時に流れる膜電流の記録と、膜の微小部分を電位固定 (patch clamp) した時に流れる単一チャンネル電流の記録をおこなった。

whole cell clamp においては、同時に電極内を各種 ATP 濃度の液で灌流し、細胞内 ATP 濃度を变化させた。標準電極内液 (mM): Aspartate, 90; KCl , 20; $MgCl_2$, 1; K_2ATP , 5; K_2CrP (クレアチン・リン酸), 10; EGTA, 5; HEPES, 5; KOH によって pH7.4 に調整 (詳細は文献 4 を参照)。

単一チャンネル電流の記録では、膜の微小部分 (patch) を電位固定したのち、その細胞の他の部分の膜を機械的あるいは化学的 (saponin による)

* 生理学研究所
(〒444 岡崎市明大寺町字西郷中38)
** 鹿児島大学第 1 内科
(〒890 鹿児島市宇宿町1208-1)

Keywords

ATP
Creatine phosphate
Ca channel
K channel

図1 ATPを含まず0.1mMの CN^- を含む液で細胞内灌流を行った際、5～7分後にみられる電流変化。

保持電位は -35mV 。330msのclamp電位を10mVおきと与え、その時の電流変化をかさねあわせて表示した。横線は電流値0を示し、上方向を、外向き電流の方向とした。

に破壊して、膜の内側の液を任意にかえることができるようにした inside-out patch (open cell-attached patch) を用いておこなった（詳細は文献5を参照）。

II. 結果および考察

1. 細胞内ATP濃度低下時の膜電流変化

ATP 1 mM 以下で細胞内灌流を行うと、保持電位(-35mV)付近での定常外向き電流が減少する。この電流は細胞内ATP濃度が充分高いときには主として内向き整流Kチャンネルを通して流れる電

流($i_{\text{K-rec}}$, i_{K2})と考えられる^{4),7)}。この電流の減少のち数分後には新たに微小振動を伴った外向き電流が、細胞内ATP濃度の低下に対応して急激に増加してくる。この増加開始時、膜イオン電流を測定すると図1右のような電流記録がえられる。

5 mM ATPを細胞内灌流して得られた電流記録と比較すると、Caチャンネルによる内向き電流(i_{Ca})の著明な減少、遅延性外向き K^+ 電流($i_{\text{K-delay}}$)の減少、過分極電位でみられる内向き電流(主に $i_{\text{K-rec}}$ からなる)の減少が明らかである。さらに保持電流の増加、脱分極電位での電流の微小振動の出

図2 図1から求めた電流-電圧関係。

Initial current は Ca^{2+} 電流のピーク，ないしは clamp 電位開始より 5~10ms で計測した。Late current は，clamp 電位開始より 300ms のところで計測した。

現が認められる。

図2に電流-電圧関係を示しているが，late current の電流-電圧関係から，活動電位のプラトーに相当する 0mV 付近を中心として，ATP 濃度の低下時に外向き電流が増加しているのがわかる。

以上の電流変化のうち， $i_{\text{K-delay}}$ および $i_{\text{K-rec}}$ の減少は，相対的に内向き電流を増加させる。したがって，この2種の電流系の減少は，膜電位に対しては脱分極方向に働き，hypoxia 時，活動電位の持続時間をむしろ延長する方向に働くと考えられる。

一方， i_{Ca} の減少は，内向き電流を減少させることにより相対的に外向き電流を増加させる。その結果，膜は過分極し，活動電位の再分極過程がはやめられる。また，細胞内 ATP 濃度の低下時に，はじめて出現，ないしは増加する外向き電流 (ATP 依存性 K 電流 $i_{\text{K-ATP}}$) もまた，膜を過分極させる (図2 late current でみられる外向き電流の増加)。

細胞内 ATP 濃度低下時には活動電位は短縮するのであるから， i_{Ca} の減少と $i_{\text{K-ATP}}$ の増加が， $i_{\text{K-delay}}$ と $i_{\text{K-rec}}$ 減少による逆方向の効果をうまわわっていると考えられる。以下 ATP 依存性 K チャンネルと Ca チャンネルについてさらに考察を加える。

2. ATP 依存性 K チャンネル

細胞内の ATP 濃度を 2 mM 以下に下げた時，

ATP 依存性 K チャンネルは，はじめて活性化され，図3上段のような単一チャンネルの記録が可能になる。2 mM 以下では ATP 濃度の低下に応じて，このチャンネルの開確率は上昇し，ATP 濃度が 0 mM 近くでは，チャンネル総数の 80% が同時に開く。

$i_{\text{K-ATP}}$ の単一チャンネルコンダクタンスは，細胞外 K^+ 濃度が 5.4 mM のとき 35 pS であり， $i_{\text{K-rec}}$ のコンダクタンス^{6),7)} の 2 倍近くの値を示す。

細胞膜の内側に Mg^{2+} , Na^+ のような陽イオンが存在しないとき，単一チャンネルコンダクタンスは電位に関係なく一定 (図3の電流-電圧関係が，まったくの直線であらわされることになる) であった。

しかし，細胞内に Mg^{2+} , Na^+ の陽イオンが存在する時，ATP 依存性 K チャンネルは，陽イオン濃度が上昇するほど，膜が脱分極するほど，これらのイオンによって強いブロックを受けた⁵⁾。

単位電流量と電位との関係から求めた逆転電位を細胞外 K^+ 濃度に対して表示したのが図3右下である。この図よりあきらかなごとく，細胞外 K^+ 濃度の 10 倍変化に対して逆転電位は 58 mV 変化する。すなわち，このチャンネルは K^+ を選択的にとおすと考えられた。

図3 ATP依存性Kチャンネルの単位電流-電圧関係。上段は単一チャンネルの開閉を示す。横線はチャンネルの閉状態のレベルを示す。細胞外K⁺濃度5.4mM/細胞内K⁺濃度150mM。細胞内Mg²⁺濃度は0.5mM。膜電位は0 mV。上段左は単位電流量を求めたamplitude histogram。下段左。細胞内K⁺濃度を150mM一定として、細胞外K⁺濃度を5.4, 50, 150mMと変えて求めた電流電圧関係。下段右はATP依存性Kチャンネルの逆転電位(E_R)と細胞外K⁺濃度との関係。

さらに、このチャンネルの開確率と膜電位との関係を調べると、開確率は電位によって変化しないことがわかった。

次に各patch膜に含まれるチャンネルの数からチャンネル密度を求めると、 i_{K-rec} とほぼ同数であり⁷⁾、

1個の心室筋細胞に分布するチャンネル総数は約3,000と推定された^{4),5)}。

以上の性質から、細胞内ATP濃度の低下によって、このチャンネルの活性が最大になる時、約2,400(チャンネル総数の80%)のチャンネルが同

図4 A. i_{Ca} の電流-電圧関係, 内向き電流のピーク値と clamp 電位を与えて100ms のところでの電流値の差を, i_{Ca} の値として計測した。
 B. i_{Ca} と i_{K-ATP} の ATP 濃度に対する関係。白抜きで表示した点は, CrP を含まない細胞内灌流液でおこなった実験を示す。
 i_{Ca} は CrP 存在下 5 mM ATP の時の値を 1 として他を相対値で表示した。CrP (ー) のときは, 5 mM ATP 灌流時の i_{Ca} を 0.5 と任意に定義して同じく相対値で示した。点線で示したものは 0 mV での i_{K-ATP} の値。

時に開き, 単位電流量が 3 pA になるプラトー電位付近では, 実に 7 nA ($\approx 3 \text{ pA} \times 2,400$) にも及ぶ外向き電流が流れることになる (図 4 A に示された i_{Ca} でも 3 nA 以下である)。

一方, 生理的条件下に細胞内に存在する Mg^{2+} , Na^+ によるこのチャンネルのブロックは, 巨大な外向き電流を緩和するように働くと考えられた。

3. Ca チャンネル

異なる ATP 濃度で細胞内灌流を行うと, 図 4 の如く, 5 mM 以上では Ca チャンネルによる内向き電流に変化はなく, 5 mM 以下で濃度依存性に抑制された。細胞内灌流液には Na^+ を含まず, かつ 5 mM EGTA が含まれているので, ATP の濃度変化に対して細胞内 Ca^{2+} 濃度は, 変化し難く, この i_{Ca} の減少は, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化に起因するとは考えにくい。

さらに, 5 mM ATP で細胞内灌流中, Mg^{2+} (1 mM) を灌流液中より除去すると i_{Ca} は, 対照の約 65% に減少した。

以上により, 図 4 でみられる i_{Ca} の減少は, Ca チャンネルの開閉に関与する膜のリン酸化において基質としての ATP 濃度が低下したためにおこることが推定された。

4. 細胞内 ATP とクレアチン・リン酸 (CrP)

灌流液中に CrP を含まない時, 図 4 B で示す如く, ATP を 5 mM から 10 mM に増加させるとそれに応じて i_{Ca} は増加する。逆に ATP 濃度を 5 mM から 2 mM に下げると, CrP 存在下では, 5 mM ATP 灌流時の i_{Ca} の大きさの 75% になるのに対して, CrP を含まない時には, 35% にも減少する。

他方, ATP 依存性 K チャンネルの活性による外向き電流の出現を観察すると, CrP 存在下では, ATP が 1 mM 以下にならないと出現しないが, CrP が存在しない時には, 2 mM ATP で灌流しても外向き電流の増加が確認された。

以上の結果より, 細胞内 ATP 濃度は, とくに膜の直下ではクレアチン・リン酸/クレアチン・キナーゼ/クレアチン系の緩衝作用によって一定に保たれていることがわかる。Hypoxia の初期, 全体としては細胞内 ATP 含量に変化が認められなくても, CrP の減少がおこれば, 膜直下の各イオン・チャンネルの周囲では, ATP 濃度の低下がおこりうることを示唆される。すなわち, 細胞内 CrP 濃度の低下によっても, i_{K-ATP} の増加あるいは i_{Ca} の減少がおこりうるだろう。

Hypoxia, あるいは虚血において細胞内 ATP あ

るいは CrP 濃度が低下すると ATP 依存性 K チャネルが活性化し, Ca チャネルは抑制を受け, 両者は共に活動電位の再分極過程に対して促進的に働く。ただし Ca 電流は脱分極が100msec 以上続くと, ほとんど不活性化しており, 残った Ca^{2+} 電流 (window current) が細胞内の ATP の減少によってさらに減少し, 再分極のおこる200~300msec のところで影響を与えるとしても, その影響は ATP 依存性 K チャネルにくらべて小さいと思われる。

〔文 献〕

- 1) Trautwein, W., Gottstein, U. & Dudel, J. : Der Aktionsstrom der Myokardfaser im Sauerstoffmangel. *Pflügers Arch.*, 260 : 40, 1954
- 2) McDonald, T.F. & MacLeod, D.P. : Metabolism and the electrical activity of anoxic ventricular muscle. *J. Physiol. (Lond.)*, 229 : 559, 1973
- 3) Taniguchi, J., Noma, A. & Irisawa, H. : Modification of the cardiac action potential by intracellular injection of adenosine triphosphate and related substances in guinea pig single ventricular cells. *Circ. Res.*, 53 : 131, 1983
- 4) Noma, A. & Shibasaki, T. : Membrane current through adenosine - triphosphate - regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 363 : 463, 1985
- 5) Kakei, M., Noma, A. & Shibasaki, T. : Properties of adenosine - triphosphate - regulated potassium channels in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. (Lond.)*, 363 : 441, 1985
- 6) Kameyama, M., Kiyosue, T. & Soejima, M. : Single channel analysis of the inward rectifier K current in the rabbit ventricular cells. *Jpn. J. Physiol.*, 33 : 1039, 1983
- 7) Sakmann, B. & Trube, G. : Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol. (Lond.)*, 347 : 641, 1984