



Title	ラット背根神経節における過分極活性化陽イオン電流 (I _h) の活性調節機構に関する研究 : 細胞内ATPの作用とプロテインキナーゼAによるリン酸化の関与について [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	駒切, 洋
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 乙第6897号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/54658
Rights(URL)	http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	You_Komagiri_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：駒切 洋

学位論文題名

ラット背根神経節における過分極活性化陽イオン電流 (I_h) の活性調節機構に関する研究：細胞内 ATP の作用とプロテインキナーゼ A によるリン酸化の関与について

1979年にウサギの洞房結節から細胞膜の過分極によって活性化する陽イオン電流が報告された。 I_h と呼称されるこの電流は、その電気生理学的性質から、心筋及び神経細胞の興奮性に寄与することが予想され、自発性の活動電位の発生頻度を決定するペースメーカー電流の一つとして、その機能や調節メカニズムが広く研究されてきた。現在までに I_h を担う分子実体として、ほ乳類では4種類のサブユニットをコードする遺伝子が同定されクローニングされている(HCN1-4)。 I_h は過分極による活性化に加え、細胞内のサイクリックヌクレオチド(cAMP, cGMP)の濃度上昇により活性化の電位依存性がシフトし、より浅い過分極によって活性化するようになることが分かっている。 I_h の研究は特に中枢神経系である脳の各領域において数多くなされており、脳波の形成や記憶のメカニズムへの関与が示唆されている。一方、 I_h の存在は末梢知覚神経である背根神経節細胞においても報告されており、ラットでは静止膜電位の形成や活動電位後の後過分極からの膜電位の復帰、神経因性疼痛の病態発現への関与など生理的に重要な役割を担っていることが示唆されている。これらの予測される生理機能はいずれも細胞の興奮性、膜電位の特性に係るものであることから、 I_h の活性化の電位依存性とその調節機構が重要となる。しかしながら、ラットの背根神経節細胞での I_h の細胞内活性調節因子による調節については cAMP の作用機序を含め詳細な検討はされておらず、特に調節機構における PKA の関与については不明である。また細胞内 ATP が cAMP の直接作用による最大活性化からさらに PKA を介して I_h を活性化させるという報告が唯一、マウスの背根神経節細胞のみで報告されており、背根神経節細胞に発現している I_h が独自の活性調節機構を有している可能性がある。そこで本研究ではラットの背根神経節細胞における I_h に対する細胞内 ATP の作用及び I_h の調節機構に対する PKA の関与の有無を明らかにすることを目的に実験を行った。実験はラットから分離し、初代培養した背根神経節細胞を用いて行った。

抗 HCN チャネルサブユニット抗体を用いた免疫細胞化学染色を行った所、培養ラット背根神経節細胞において、HCN2 または HCN4 サブユニットが発現している可能性が示唆された。培養ラット背根神経節細胞をホールセルボルテージクランプ法により電位固定し、過分極パルスを与えたところ、 I_h として知られるイオン電流の特徴を有する内向きのイオン電流が観察された。この電流の最大活性化電位における活性化の時間経過の時定数は、HCN2 または HCN4 サブユニットで構成されるチャネルにおいて報告された値と近い値

であり、免疫細胞化学染色で得られた結果と同様、これらのサブユニットが培養ラット背根神経節細胞における I_h を担う HCN チャンネルの構成に関与している可能性を示唆していた。電極内液に cAMP を添加すると I_h の活性化曲線が約 15 mV 正の方向へシフトした。同様に、ATP を添加することによっても活性化の電位依存性が正にシフトすることが確認された。アデニル酸シクラーゼ阻害剤である SQ 22, 536 はこの細胞内 ATP による I_h の活性化効果には影響を与えなかった。さらに、 I_h の活性化は非加水分解性の ATP 類似物質である ATP- γ -S と AMP-PNP によっても再現された。これらの結果は細胞内に添加した ATP がアデニル酸シクラーゼを介した cAMP 産生及びプロテインキナーゼによるリン酸化を介さずにラット背根神経節の I_h を活性化できることを示唆している。

ラットの知覚神経節細胞の電位依存性カルシウムチャンネル電流は PKA によって活性調節を受けることが報告されている。そこで、 I_h を測定する細胞と同じ細胞から電位依存性のカルシウムチャンネル電流を測定し、対象としている個々の細胞のホールセルボルテージクランプ条件下での PKA 活性の指標とすることで、さらに詳細に I_h の調節機構への PKA 関与の可能性を検討した。コントロール電極内液を用いた条件下では電位依存性カルシウムチャンネル電流の振幅は時間経過とともに急速に減少した (rundown)。この rundown は電極内液に ATP または PKA の触媒サブユニット (PKAc) を添加することによって大幅に抑制された。ATP によるカルシウムチャンネル電流の rundown の抑制効果は細胞内に添加した PKA 阻害ペプチド (PKI) によって有意に阻害された。一方で PKI は ATP 存在下での I_h の電位依存性には影響を与えなかった。この結果は ATP の I_h の電位依存性への活性化作用にはやはり PKA によるリン酸化の関与がないことを示唆している。PKAc 存在下でフォスファターゼ阻害剤であるオカダ酸を細胞外液へ適用すると、オカダ酸は PKAc の効果を増強し rundown を強く抑制するだけでなく、一部の細胞では振幅の増大を引き起こした。この電位依存性カルシウムチャンネル電流の rundown を十分に抑制する条件で測定された I_h の活性化の電位依存性はコントロールと有意な差は認められなかった。一方、 I_h 測定後も同一細胞の電位依存性カルシウムチャンネル電流の振幅は維持されており、 I_h を測定した条件でも PKA 活性は十分上昇していたことが確認された。これらの一連の結果は、ラット背根神経節細胞の I_h の電位依存性の調節機構には PKA によるリン酸化の関与が無いことを示唆している。また、PKA 活性の増強は最大活性化電位における I_h の電流密度及び活性化の時間経過の指標である時定数 (τ) に対する有意な影響を与えなかった。

以上の成績からラットの背根神経節細胞の I_h の電位依存性はアデニル酸シクラーゼ及び PKA の関与の無いメカニズムを介して細胞内の ATP によって調節を受けることが明らかとなった。さらに、ラットの背根神経節細胞の I_h の電位依存性、コンダクタンス及び活性化の時間経過を調節するメカニズムに PKA によるリン酸化の関与はないか、あっても寄与は低いと結論付けた。