



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Author(s)	駒切, 洋
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6897号
Issue Date	2013-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.r6897
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54664
Type	doctoral thesis
File Information	You_Komagiri.pdf



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

駒切 洋

目次

目次	1
略語一覧.....	3
I 緒論.....	4
II 材料及び方法	8
1 実験動物.....	8
2 ラット背根神経節細胞の分離、初代培養	8
3 免疫細胞化学染色.....	9
4 膜電流測定法	10
5 使用薬物.....	13
6 解析、統計処理.....	14
III 結果.....	15
1 初代培養ラット背根神経節細胞における HCN チャネルサブタイプ特異的抗体を用いた免疫細胞化学染色	15
2 培養ラット背根神経節細胞の過分極活性化陽イオン電流 (I_h)の電気生理学的性質	16
3 I_h の活性化の電位依存性.....	21
4 細胞内 ATP 存在下での I_h の電位依存性に対するアデニル酸シクラーゼ阻害薬の効果	26
5 I_h の活性化の電位依存性に対する ATP 非加水分解性類似物質の効果	29
6 細胞内 ATP による I_h の活性化作用に対するプロテインキナーゼ阻害剤の効果	29
7 Cs-rich 電極内液使用時の I_h の電気生理学的性質	31
8 ラット背根神経節細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流の振幅の経時的変化に対する細胞内 ATP の効果.....	37
9 電位依存性カルシウムチャネル電流に対するプロテインキナーゼ A 阻害剤の効果.....	39
10 細胞内 ATP の I_h の電位依存性への効果に対する PKI の作用.....	42

11 I_h の活性化の電位依存性に対する PKA 触媒サブユニットの効果	42
12 I_h の活性化の時間経過に対する PKA 触媒サブユニットの効果	50
IV 考察	55
1 培養ラット背根神経節における HCN サブタイプと I_h の電気生理学的性質	55
2 細胞内 cAMP 及び ATP の I_h に対する効果	56
3 I_h の活性調節機構に対する PKA の関与の可能性	58
V 総括	62
謝辞	65
英文抄録	66
引用文献	69

略語一覧

4-AP: 4-aminopyridine

AMP-PNP: Adenosine 5'-(β , γ -imido) triphosphate

ATP- γ -S: Adenosine 5'-[γ -thio]triphosphate

CNBD: cyclic nucleotide binding domain (サイクリックヌクレオチド結合ドメイン)

DRG: dorsal root ganglion (背根神経節)

H-89: N-[2-(*p*-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochloride

H-85: N-[2-(*N*-formyl-*p*-chlorocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide

HCN channel: hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated channel

I_{Ba} : Ba^{2+} -carried inward currents through voltage-gated Ca^{2+} channel (バリウム電流)

I_h : hyperpolarization-activated cation current (過分極活性化陽イオン電流)

K : slope factor for the activation curve of I_h

MDL-12,330A: cis-N-(2-Phenylcyclopentyl)-azacyclotridec-1-en-2-amine hydrochloride

OA: okadaic acid (オカダ酸)

PKA: cAMP-dependent protein kinase (cAMP依存性プロテインキナーゼ)

PKAc: catalytic subunit of PKA (PKA触媒サブユニット)

PKI: protein kinase inhibitor (PKA阻害ペプチド)

R_s : series resistance (接続抵抗)

SQ 22,536: 9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine

TEA: tetraethyl ammonium

τ_{fast} : fast activation time constant (早い成分の時定数)

τ_{slow} : slow activation time constant (遅い成分の時定数)

TTX: tetrodotoxin

V_{half} : membrane potential for half-maximal activation of I_h (最大活性化の1/2の活性化を示す膜電位)

I 緒論

運動、内臓機能の調節、感覚の伝達といった神経系の機能の多くは、その細胞膜上に発現している種々のイオンチャネルやポンプを介したイオンの細胞内外の出入りにより発生した電氣的信号が、軸索を伝導し、情報や刺激として標的器官に伝達されることにより実現されている。イオンチャネルの開閉機構、コンダクタンス、電位依存性等の性質は様々な要因、条件によって調節を受けており、その調節機構はイオンチャネルの機能的役割と密接に関連している。

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 (Brown *et al.* 1979)。現在、 I_h (hyperpolarization-activated cation current) と総称されているこの電流は当初、電位依存性のナトリウム電流やカルシウム電流とは異なり、細胞膜の過分極によって緩やかな時間経過で活性化し、活性化後の不活化も見られない等、その電気生理学的な特徴が奇妙である (funny) として I_f (funny current) 又は I_q (queer current) と呼ばれた (心臓組織で見られる I_h を特にさす場合は現在も I_f と呼称される)。 I_h の特徴として、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によって調節を受けることが知られている (Pape 1996)。 I_h は細胞内のサイクリックヌクレオチド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。その後、同様の性質を持つ電流が他の動物種の心臓組織や多くの中枢、末梢神経系の細胞で観察された。 I_h は K^+ に加え Na^+ もチャージキャリアとする陽イオン電流であるため細胞の静止膜電位より浅い反転電位を持ち、活性化により膜電位を緩やかに脱分極させる性質を持つことから、心筋及び神経細胞の興奮性に寄与することが予想され、特に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 (Pape 1996; Robinson and Siegelbaum 2003; Santoro and Tibbs 1999)。これまでの研究から、 I_h の性質は観察される組織や細胞ごとにいくつかの点で差が見られることが分かっている。例えば、海馬CA1領域で観察される I_h は過分極刺激後の活性化のスピードが早く、cAMPによる電位依

存性のシフトが比較的弱い (5 mV以下)という特徴を持ち、一方で心臓プルキンエ細胞から観察される I_h (I_f)は活性化の時間経過が遅く、cAMPによって電位依存性が15~20 mVシフトするという特徴を持つ (Biel *et al.* 1999)。これらの差異の原因の1つは I_h を担うチャネル分子のサブユニット構成の違いによると考えられている。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: Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide gated channel, Ishii *et al.* 1999; Ludwig *et al.* 1998)。HCNサブユニットは6回の膜貫通部位とC末端の細胞内領域にcAMPまたはcGMP依存性のプロテインキナーゼ (PKA, PKG)と相同性の高いサイクリックヌクレオチド結合ドメイン (cyclic nucleotide binding domain: CNBD)を持ち、4量体を構成することによってチャネルとして機能する (Biel *et al.* 1999; Ludwig *et al.* 1998)。各サブユニットのホモ4量体からなるHCNチャネルの電流はそれぞれ I_h の基本的な特徴を共有する一方で、活性化の時間経過やcAMPに対する感受性にサブタイプ間で違いが見られることが報告されている (Biel *et al.* 2009)。活性化の時間経過に関してはHCN1が最も早く活性化し、HCN4が最も遅い。また、cAMPによる電位依存性のシフトはHCN2、HCN4ともに大きく、HCN1の感受性は弱いことが分かっている。また、HCN3チャネルはcAMPによる調節を受けないか、むしろ電位依存性が負にシフトするという生体で見られる I_h とは異なる特徴が報告されている (Mistrik *et al.* 2005)。さらに、HCNサブユニットは異なるサブユニット同士の組み合わせでヘテロ4量体を構成することも明らかになっている (Altomare *et al.* 2003; Ulens and Tytgat 2001; Whitaker *et al.* 2007; Ye and Nerbonne 2009)。その際、機能的に発現したヘテロHCNチャネルは各サブユニット単独で発現させた場合の中間型の性質を持つことが分かっている (HCN3は少なくともHCN2とはチャネルを構成せず、むしろHCN2の発現量を低下させる, Much *et al.* 2003)。実際にHCNサブユニットの発現分布は組織ごとに異なっており、心臓組織ではHCN4が、大脑海馬のCA1領域ではHCN1の発現量が最も多く、これらの組織から測定される I_h の特徴と発現しているHCNサブタイプの特徴との間に対応が見られることが報告されている (DiFrancesco 2010; Santoro *et al.* 2000)。HCN3の発

現レベルはいずれの組織も低く、機能的なチャネルへの関与は現在も議論が分かれている (Biel *et al.* 2009)。

HCNチャネルに対するサイクリックヌクレオチドによる調節の作用機序はCNBDに対する細胞内サイクリックヌクレオチドの直接作用によると考えられて来た。一方で、ラットの嗅覚受容体、ウシガエル of 交感神経、イヌのプルキンエ線維及び心室筋において、PKAの活性化が I_h の電位依存性のシフト、コンダクタンスの増大、活性化の時間経過の加速等を引き起こすことが報告されている (Abi-Gerges *et al.* 2000; Tokimasa and Akasu 1990; Vargas and Lucero 2002)。そのため、 I_h のcAMPによる調節機構にCNBDに対する直接作用だけでは説明できない経路が関与している可能性が予想される。また近年、HCN4チャネルがPKAによるリン酸化によっても活性化を受けることが報告された (Liao *et al.* 2010)。HCNサブユニットにはいずれもPKAによるリン酸化の共通配列が存在することから、PKAの関与する調節機構が他のサブユニットから構成される I_h にも存在する可能性がある。

I_h の研究は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 (Robinson and Siegelbaum 2003)。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 (Chaplan *et al.* 2003; Masuda *et al.* 2006; Wang *et al.* 1997)。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ので、それに寄与する 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 (Raes *et al.* 1997)。

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主に電気生理学的手法を用いて実験を行った。PKAの関与についてはcAMPとその類似物質はHCNチャネルに直接作用する可能性があるため、PKAの触媒サブユニットを用いてその作用を観察した。

なお、本成績の一部は以下の2編の原著論文として公表されている。

- 1) Komagiri Y and Kitamura N. Effect of intracellular dialysis of ATP on the hyperpolarization-activated cation current in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol* 90: 2115-2122, 2003.
- 2) Komagiri Y and Kitamura N. Comparison of effects of PKA catalytic subunit on I_h and calcium channel currents in rat dorsal root ganglion cells. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* 28: 177-189, 2007.

II 材料及び方法

1 実験動物

動物実験は「北海道大学における動物実験に関する指針」に従って行った。実験には7～12週齢の雄のSprague-Dawleyラット（SPF、体重240～400 g；日本クレア、東京）を使用した。

2 ラット背根神経節細胞の分離、初代培養

ラットから背根神経節細胞を分離し、初代培養を行った。以下にその概略を示す。

ラットはエーテル麻酔後、頸椎脱臼法で安楽殺し、脊椎と脊髄を含む後背部組織を切り離した。脊椎を長軸方向に沿って分割し、脊髄を取り除いた後、氷冷した無 Ca^{2+} - Mg^{2+} リン酸緩衝生理食塩水 (Ca^{2+} , Mg^{2+} -free phosphate buffered saline; CMF-PBS)中に背根神経節を回収した。CMF-PBSは以下の組成で作成し、濾過滅菌したものを用いた: 137 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH_2PO_4 ; 8 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (pH = 7.4)。純度の高い神経細胞を得るために、実体顕微鏡下で外科用メス又は眼科用ハサミを使って神経節に付随した神経束をトリミングした。集めた神経節を滅菌済みの遠心チューブに移し、CMF-PBSを取り除き、コラゲナーゼ溶液を加え、37°Cの恒温槽中で2時間振盪した。コラゲナーゼ溶液を取り除いた後、トリプシン溶液を加え、37°Cの恒温槽中で15分間振盪した。コラゲナーゼ溶液及びトリプシン溶液は CMF-PBS にウシ血清アルブミン (BSA, 1 mg/ml, Sigma, USA)、DNase I(0.12 mg/ml, Sigma)を添加したものにコラゲナーゼ Type IV (約 500 U/ml, Worthington Biochemicals, USA)、又はトリプシン (0.25%, Sigma)をそれぞれ添加し、シリンジフィルター(0.2 μm)を用いて濾過滅菌したものをを用いた (BSAは基質濃度をある程度高くすることによってタンパク質分解酵素の酵素活性を高く維持することを目的に添加した)。トリプシン溶液を取り除いた後、培養液を加え、シリコン加工したパスツールピペットを用いて組織を吸い込み吹き出す操作 (ピペッティング)を20回行った。培養液には10%ウシ胎児血清 (FBS)を

添加したダルベッコ改変イーグル培地(GibcoBRL, USA)をボトルトップフィルターで濾過滅菌したものにpenicillinとstreptomycinをそれぞれ100 U/ml、100 μ g/mlの濃度になるように加えたものを用いた。数分間静置した後、上清を新しい滅菌済遠心チューブに移し遠心した(800 $\times$ g、8分間)。上清を捨てた後、沈渣に培養液を加えてピペティングを20回行い細胞を浮遊させた後、再び遠心(300 $\times$ g、10分間)を行った。この遠心洗浄操作を3回繰り返した。上清を捨てた後、沈渣に培養液を1.2~1.5 ml加え、ピペティングを行い細胞を浮遊させた。直径35 mmの滅菌済カルチャーディッシュ5枚に乾熱滅菌(160°C、1時間)した直径15 mmの円形カバーガラス(15丸 No.1, 松波硝子)を3枚ずつ適当な間隔をおいて並べ、poly-D-lysine水溶液(0.1 mg/ml, Sigma)をカバーガラス上に滴下して5分間静置した。その後poly-D-lysine水溶液を除去し、滅菌蒸留水で水洗した後、カバーガラスを乾燥させた。分離した細胞の細胞浮遊液をpoly-D-lysine処理をしたカバーガラス上に80~150 μ lずつ滴下し、CO₂インキュベーター内で5% CO₂/95%Air、37°Cという条件下で培養を開始した。培養開始翌日に線維芽細胞の増殖を抑制するためにcytosine β -D-arabinofuranoside hydrochloride (5 μ M, Sigma)を添加した培養液を追加し、3日間培養した。その後は標準の培養液に交換し、3日毎に新鮮な培養液に交換した。実験には培養開始から4~14日の細胞を用いた。

3 免疫細胞化学染色

ラットから分離後、円形カバーガラス上で4~10日間培養したラット背根神経節細胞を使用した。細胞をCMF-PBSで洗浄した後、99.5%メタノールで、-20°C、30分間処理することにより固定した。メタノールを取り除き、CMF-PBSで洗浄した後、0.1%Triton Xを添加したCMF-PBS溶液中に5分間浸した。Triton X溶液をのぞき、CMF-PBSで洗浄した後、神経細胞が持つ内在性のペルオキシダーゼ活性を除くため、3%過酸化水素溶液中に30分間浸した。洗浄後、ブロッキング溶液を滴下し、室温、30分間処理した。ブロッキング溶液はCMF-PBSに10%ヤギ正常血清(NGS)、3% BSA、0.1% Tween20を添加したものを使用した。ブ

ロッキング溶液を除去し、カバーグラス上にブロッキング溶液で希釈した1次抗体を滴下し4°Cで一晩処理した。抗HCN1抗体は50希釈、抗HCN2及び抗HCN4抗体は500倍希釈したものを用いた。洗浄後、ブロッキング溶液で500倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体 (二次抗体)を滴下し、室温で一時間処理した。二次抗体を洗浄後、カバーグラスを顕微鏡下で観察しながらDAB溶液(3,3'- diaminobenzidine 0.1-1 mg/ml, 0.03%過酸化水素水)を滴下し、発色の進行を確認した。3~5分後、染色反応を止めるために冷CMF-PBSに浸した。カバーグラスを順に25%、50%、75%、100%のエタノール及びキシレンに浸漬し脱水した後、封入材 (Entellan neu, Merck)を使って封入した。一次抗体の特異性は希釈した各抗体とコントロール抗原ペプチド (100倍希釈, control antigen peptides, Alomone Laboratory)を混合したものを一次抗体として使用し、陽性反応が検出されないことで確認した。倒立顕微鏡に設置したデジタルカメラで標本を撮影し、画像を保存した。パーソナルコンピュータ上でソフトウェア、ImageJ (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を使い、褐色に染まった陽性細胞と染色されない陰性細胞の直径を計測した。

4 膜電流測定法

背根神経節細胞からの膜電流の測定はホールセルボルテージクランプ法を用いて行った。以下にその概略を示す。

A 実験装置

厚さ0.5 cmのアクリル板に直径約2.0 cmの穴をくり貫き、底面にカバーグラスを高真空用グリースを使って密着させた物を容量約1.5 mlの実験槽として用いた。実験槽は倒立顕微鏡のステージ上に設置した。実験槽にはマニピュレーターに接続したピペットを静置し、このピペットから静水圧により新鮮な実験灌流液を流速約1 ml/minで導入した。さらに実験槽に先端を細く引いたガラス管を設置し、アスピレーターと接続して実験液の吸引除去を行った。膜電流測定用のガラス電極(パッチ電極)は芯入ガラス管(GD-1.5, 成茂)を専用の微小電極作製器 (PB-7, 成茂)を用いて二段引きしたものを使用した。パッチ電極の先端抵抗は2~4MΩに

なるように調節した。不関電極及びパッチ電極用の銀線は分極を抑えるため銀線を銀塩化銀加工したものを用いた。不関電極と実験灌流液は塩橋を用いて電氣的に接続した。塩橋は3MKCl液に1%アガロースを加熱融解したものをポリエチレンチューブに注入し作製した。パッチ電極より検出される電流反応はパッチクランプ用増幅器 (CEZ-2400, 日本光電)を介して測定した。パッチクランプ用増幅器にパーソナルコンピュータ(Macintosh, Apple)で制御されたAD/DAコンバーター(MacLab/4S, AD Instruments)を接続し、ソフトウェア(Scope v3.6.10, AD Instruments)上でパッチ電極と不関電極間にかかる電圧を制御しながら両電極間を流れる電流を記録した。

B ホールセルボルテージクランプ法

パッチ電極に電極内液を先端から0.5 cm程度満たし、電極ホルダーに装着した。パッチクランプ用マイクロマニピュレータ (ONU-31P, オリンパス)を操作し、電極先端を目的の細胞に近接させた。パッチ電極に電圧パルス(-1 mV)を頻度5 Hzで与え、それによって生じる電流から電極抵抗を計測し適当な電極抵抗(2~4M Ω)であることを確認した。パッチ電極先端を細胞に当て、電極ホルダー側管につないだ注射筒を吸引し、抵抗値を最終的に2~5G Ω まで上昇させた(ギガシール形成)。増幅器を操作し、電極内電圧を実験に応じて-30 mV、-60 mVまたは-80 mVに固定した。この状態で電極ホルダー側管につないだ注射筒を吸引しパッチ膜を破壊した。パッチ膜の破壊は電圧刺激による容量性の電流が急激に増大することから判断した。実験にあわせて設定した保持電位 (-30 mV、-60 mVまたは-80 mV)からの様々な電位へのパルス刺激の際に測定されるホールセル電流を記録した。また、保持電位から-5 mVまたは-10 mVのステップパルスを与えたときに発生する容量性のサージ電流の面積と減衰時の電流トレースを指数関数で近似することによって求めた時定数 (τ)から個々の測定結果における細胞膜容量 (C_m)及び接続抵抗 (R_s)を計算した。 I_h の電位依存性を調べる際には R_s による電圧降下 (voltage-drop)を補正した上で解析を行い、活性化曲線を決定した。

I_h のみを単独で測定する際には、以下の組成の細胞外液と電極内液を使用した。

標準細胞外液 : 140 mM NaCl; 6 mM KCl; 1.2 mM MgCl_2 ; 2.5 mM CaCl_2 ; 10 mM D-glucose; 10 mM HEPES (pH = 7.4 にNaOHで調整).

K-rich電極内液: 140 mM K-methanesulfonate (KMeSO_4); 2 mM MgCl_2 ; 1.1 mM EGTA; 10 mM HEPES (pH = 7.2にKOHで調整).

I_h の電位依存性を調べる際には電位依存性のナトリウムチャネル電流及びカリウムチャネル電流の混入を最小限にとどめるため、上記の細胞外液中に0.5 mM BaCl_2 , 2 mM 4-aminopyridine (4-AP)、3 mM tetraethyl ammonium (TEA)、0.5 μM tetrodotoxin (TTX)を添加した条件で実験を行った。

I_h と電位依存性カルシウムチャネル電流を同一細胞から測定する際には、以下の組成の細胞外液と電極内液を使用した。

I_h 測定用細胞外液 : 154 mM NaCl; 6 mM KCl; 2.5 mM CaCl_2 ; 1.2 mM MgCl_2 ; 10 mM Hepes; 10 mM glucose; 2 mM 4-AP; 3 mM TEA; 0.5 mM BaCl_2 ; 0.5 μM TTX (pH = 7.4 にNaOHで調整).

I_{Ba} 測定用細胞外液 (低 Na^+ 細胞外液): 24 mM NaCl; 130 mM choline-Cl; 6 mM KOH; 5 mM BaCl_2 ; 5 mM MgCl_2 ; 10 mM Hepes; 10 mM glucose; 2 mM EGTA-2Na; 2 mM 4- AP; 3 mM TEA; 0.5 μM TTX (pH = 7.4 にHClで調整).

Cs-rich電極内液: 130 mM Cs-glutamate; 5 mM K-glutamate; 5 mM NaCl; 2 mM MgSO_4 ; 1 mM CaCl_2 ; 10 mM EGTA-2Cs; 10 mM Hepes (pH = 7.4 にCsOHで調整)

電位依存性カルシウムチャネル電流は細胞外液中の CaCl_2 を BaCl_2 に置換し、 Ba^{2+} をチャージキャリアとするバリウム電流 (I_{Ba})として測定した。 I_{Ba} の測定にはTTX非感受性の電位依存性ナトリウムチャネル電流の影響を減じるため、 Na^+ 濃度を下げた組成の細胞外液 (低 Na^+ 細胞外液)を使用した。 I_{Ba} と I_h の同一細胞からの測定には脱分極刺激をした際の電位依存性カリウムチャネル電流の混入を抑制するためCs-glutamateを主体とした電極内液 (Cs-rich電極内液)を使用した。電位依存性カルシウムチャネルの細胞内 Ca^{2+} 依存性の不活性化を抑制するた

め、遊離 Ca^{2+} 濃度が 10^{-8}M になるようにEGTAと CaCl_2 の濃度を調整した。EGTAと CaCl_2 の濃度はソフトウェア (Maxchelator software, Stanford University)を用いて算出した。

K-rich電極内液と標準細胞外液との間に生じる液間電位 (約3.3 mV) については電極内電位の補正は行わなかった。Cs-rich電極内液と細胞外液との間に生じる液間電位 (約15 mV) はギガオームシール形成前にパッチクランプアンプ上であらかじめ補正した上で実験を行った。

5 使用薬物

使用した薬物と試薬は以下のとおりである。

AMP-PNP, ATP, ATP- γ -S, 4-AP (4-aminopyridine), cAMP, H-89, H-85, MDL-12,330A, nifedipine, PKAc (catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase), PKI (a peptide inhibitor of PKA), SQ 22,536, TEACl (tetraethylammonium chloride), TTX (tetrodotoxin)はSigma (St. Louis, MO, USA)より購入した。フォルスコリン (forskolin), オカダ酸 (Okadaic acid)は和光純薬 (大阪)より購入した。抗HCN1抗体、抗HCN2抗体および抗HCN4抗体はAlomone Laboratory (Jerusalem, Israel)より購入した。ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギIgG抗体はMolecular Probes (Eugene, OR, USA)より購入した。

AMP-PNP、ATP- γ -S、ATP、cAMPはそれぞれ実験使用時の目的の濃度になるように電極内液に溶解し、サンプルチューブに分注して -20°C で保存した。ATPは別に4 mMの濃度になるようCs-rich電極内液に溶解したものを作製し、 -20°C で保存した。PKAcは電極内液に500 U/mlの濃度になるように溶解し、 4°C で保存した。これを実験直前にコントロール電極内液又は4 mM ATPを入れた電極内液と等量混合して実験に使用した。PKAcを入れた電極内液は作製後一週間以内に使いきった。PKIは純水に溶解した0.5 mMのストック溶液を作製し -20°C で保存し、実験開始直前に融解し目的の濃度になるように電極内液に添加した。さらに、100 μM になるようにPKIを溶解した電極内液も作製し、分注して -20°C で保存した。これは高濃度PKI (50 μM)の効果を調べる際に4 mM ATPを含む電極内液と等量混合して使用

した。TEA及び4-APは目的の濃度になるように細胞外液中に溶解した。H-89、H-85はメタノールに溶解した10 mMのストック溶液を作製した。フォルスコリン、nifedipine、MDL-12,330Aはdimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解し、10 mMのストック溶液を作製した。オカダ酸はDMSOに溶解し、1 mMのストック溶液を作製した。TTX、SQ 22,536は純水に溶解し、それぞれ1 mM、100 mMのストック溶液を作製した。これらのストック溶液はいずれも-20°Cで保存し、実験に際して目的の濃度に希釈して使用した。

6 解析、統計処理

本文中及び図中のデータは平均値±標準誤差（n = 例数）で表示した。有意差検定はStudent の *t* 検定を用いて行い、5%を統計的有意水準とした。Boltzmann の式による回帰は統計用ソフトウェア（IGOR Pro 4.08J, Wave Metrics）を用いて行った。

III 結果

1 初代培養ラット背根神経節細胞における HCN チャネルサブタイプ特異的抗体を用いた免疫細胞化学染色

背根神経節中に存在する神経細胞は複数の異なる性質、機能を持つ”ヘテロ”な細胞の集団である。背根神経節には体性感覚神経系の一次求心性神経の細胞体が存在し、末梢の感覚受容器からのインパルスの中樞へと伝える。一次求心性神経は軸索の伝導速度と太さ、髄鞘の有無によって、太く有髄で伝導速度の早いA α 、A β 線維、細く有髄のA δ 線維、無髄で細く伝導速度の遅いC線維に分類される。A α 線維は骨格筋の伸張、A β 線維は触圧を伝え、A δ 及びC線維は痛みと温冷覚を伝える。背根神経節中に存在する神経細胞の細胞体は直径の異なる集団が混在しており、一般に、小型細胞 (small)はC線維、中型細胞 (medium)はA δ 線維、大型細胞(large)はA α / β 線維の軸索を持つことが多いことが分かっている (Harper and Lawson 1985a; b)。これら複数種類の細胞の集団である背根神経節細胞では、観察されるイオン電流や発現しているイオンチャネル、受容体の分布が異なることが分かっている。新鮮分離したラットの背根神経節細胞では異なるグループのニューロン (small, medium, large) でそれぞれ異なる電気生理学的特徴をもつ I_h が見られることが報告されており、特に大細胞における I_h は他の細胞よりも活性化の時間経過が早く、より浅い過分極で活性化することが示されている (Scroggs *et al.* 1994; Tu *et al.* 2004)。さらに、ラットの背根神経節スライス標本ではHCN2サブユニットの発現はすべての大きさの細胞に広範に観察されるのに対し、HCN1サブユニットを発現している細胞には大直径を持つものが多いことが報告されている (Tu *et al.* 2004; Vasilyev *et al.* 2007)。また、ラットの背根神経節におけるHCN4サブユニットの発現は他のサブユニットと比較してごく弱いことが報告されている (Kouranova *et al.* 2008; Tu *et al.* 2004)。 I_h の電気生理学的な性質は、その電流を担うチャネルタンパクを構成するサブユニット (HCN1-4)のサブタイプの違いによって大きく影響を受けることが知られているため、対象としている組織で発現しているサブユニットの種類や分布を知ることは非常に重要

である (Ishii *et al.* 1999; Ludwig *et al.* 1998)。そこで、初代培養を行ったラットの背根神経節細胞において、発現しているHCNサブタイプ及びその発現の分布に細胞直径による偏りがあるかを確認するため、HCN1、HCN 2及びHCN 4に対する特異抗体を用いて免疫細胞化学染色を行った。培養ラット背根神経節細胞において、HCN1抗体陽性の細胞 (図1)が観察されたが、その割合は少なく、全体の5%以下だった。HCN1陽性の細胞の直径の平均値は 30.6 ± 1.5 ($n = 14$)だった。HCN2抗体陽性反応は直径18~48 μm の範囲の多くの細胞で観察された (図1)。HCN2抗体陽性及び陰性細胞の細胞体の直径の平均値はそれぞれ 26.7 ± 0.5 μm ($n = 150$)、 26.9 ± 0.4 μm ($n = 108$)だった。陽性細胞と陰性細胞の直径には有意な差は見られなかった ($p = 0.76$)。さらに、HCN4抗体を用いた場合も陽性シグナルを示す細胞 (直径14~44 μm)が多数観察された (図1)。陽性細胞の直径の平均値は 24.9 ± 0.5 μm ($n = 111$)で陰性細胞 (25.4 ± 0.5 μm , $n = 112$)との差はなかった ($p = 0.47$)。図2にHCN2及びHCN4抗体陽性、陰性細胞の細胞直径のヒストグラムを示した。ラットの培養背根神経節細胞に発現しているHCN2及びHCN4サブタイプの発現分布は少なくとも細胞直径によって明確な偏りは見られず、それによって電気生理学的実験を行う個々の細胞に発現しているHCNのサブタイプを予測することは困難であることが分かった。細胞によって I_h を担うHCNチャネルの構成が異なる可能性は否定できないが、本研究では以降の実験で得られた電気生理学的データを区別せず、まとめて培養ラット背根神経節の I_h として解析した。

2 培養ラット背根神経節細胞の過分極活性化陽イオン電流 (I_h)の電気生理学的性質

初代培養したラットの背根神経節細胞から直径15~40 μm (28.3 ± 1.0 μm , $n = 53$)の細胞を選択し、ホールセルボルテージクランプ法を用いて全細胞電流の測定を行った。細胞を電位固定したのち、保持電位-60 mV から-130 mV まで持続時間2 sの過分極パルス与えた。膜電位を-80 mV より過分極させると緩やかな時間経過で活性化する内向き電流が観察さ

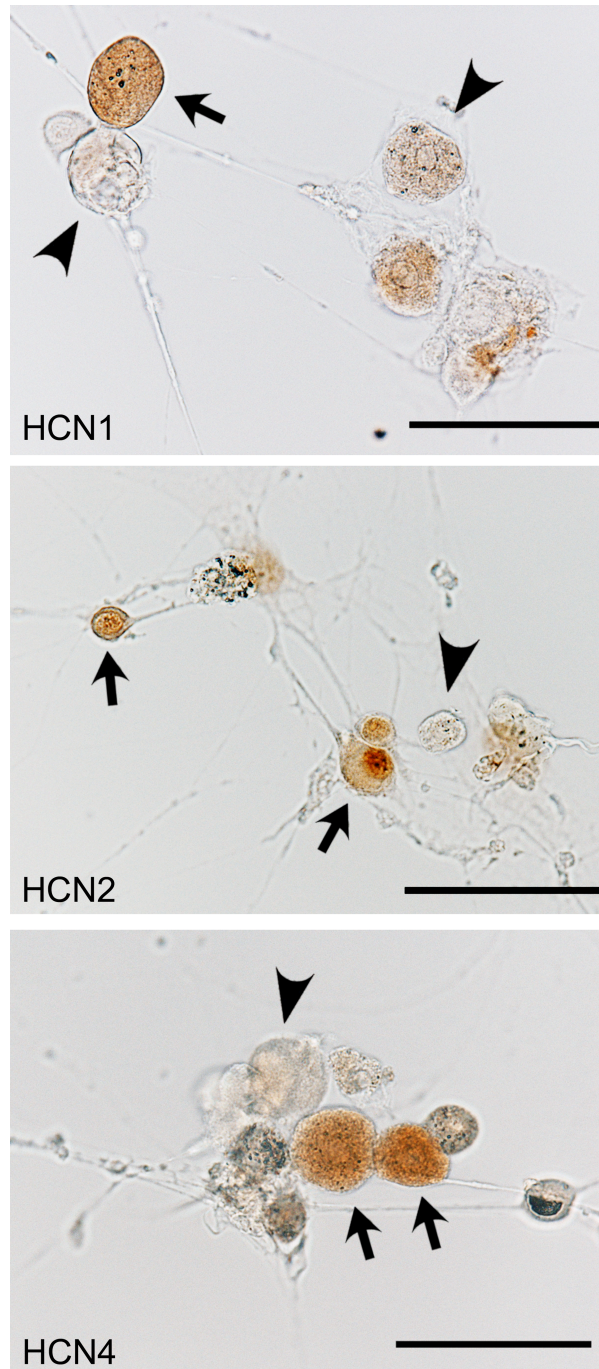


図1. 初代培養ラット背根神経節細胞に対するHCNチャンネルサブタイプ特異的抗体を用いた免疫細胞化学染色

抗HCN1、HCN2及びHCN4抗体を用いて免疫細胞化学染色を行った背根神経節細胞の光学顕微鏡像。矢印は強い抗体陽性反応を示した背根神経節細胞を指し、矢頭は陰性または弱い陽性反応を示した細胞を指している。 スケール:50 μ m

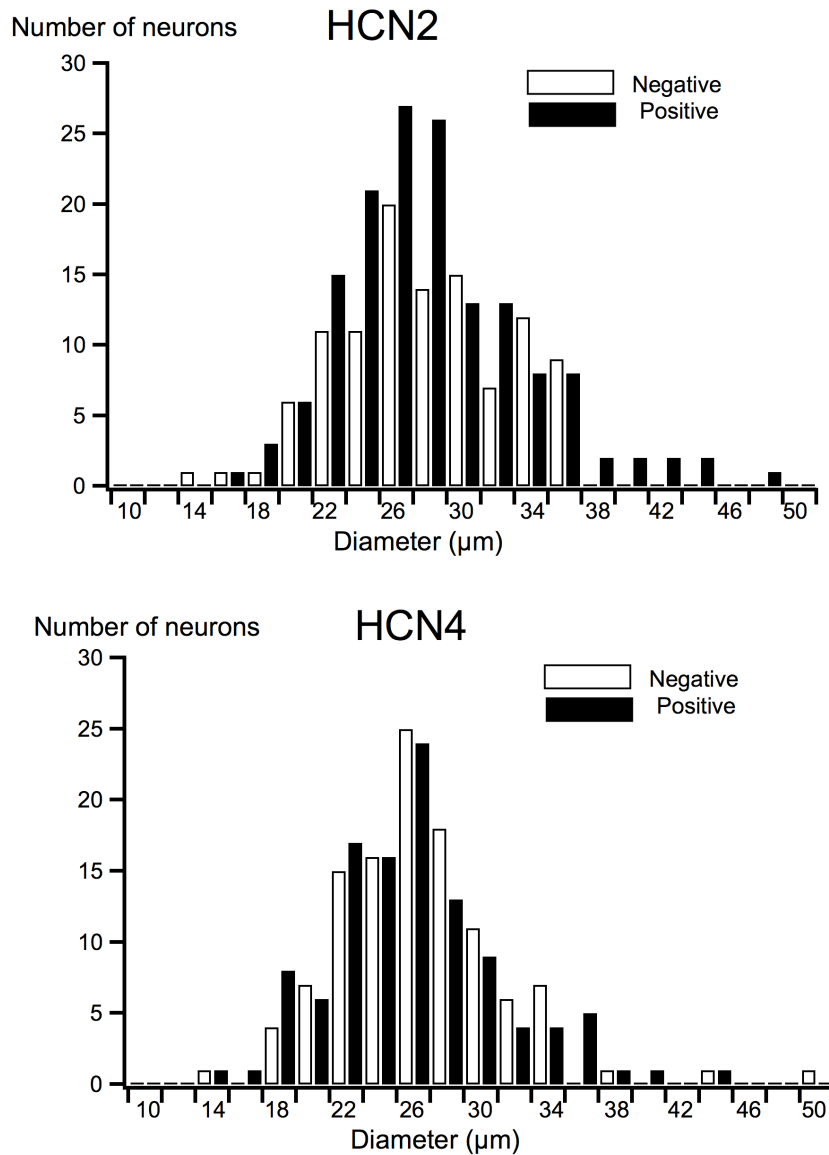


図2 培養ラット背根神経節細胞における細胞直径と抗HCNサブユニット抗体陽性、陰性細胞数のヒストグラム

抗HCN2抗体及び抗HCN4抗体を用いた免疫組織化学的染色によって褐色に染まった陽性細胞 (Positive)と染色されなかった陰性細胞 (Negative)の細胞直径を測定し、細胞直径による分布を比較した。

れた (図 3A)。この電流はパルスを与えている間に不活性化することではなく、過分極パルス終了後、緩やかな脱活性化が見られた。過分極パルスによって発生した電流のうち、パルスを与えた瞬間に発生する一過性の細胞膜容量性のサージ電流直後に見られる内向き電流の最小値を instantaneous current、パルス終了直前の電流を steady state current と定義した (図 3A)。図 3B は instantaneous current、steady state current それぞれの振幅の電流密度の電流-電圧関係を示している。以降の実験では instantaneous current、steady state current の差を過分極パルスによって時間依存性に活性化した正味の I_h (= hyperpolarization-activated cation current) としてその性質を調べた。

I_h の持つ特徴的な薬理学的性質として、mM オーダーの細胞外 Cs^+ によってほぼ完全に抑制される一方、細胞外 Ba^{2+} に対しては非感受性又は低感受性であることが知られている (Ludwig *et al.* 1998; Pape 1996)。培養ラット背根神経節細胞において細胞外に 2 mM の CsCl 及び BaCl_2 を適用した際の -130 mV における I_h の抑制率はそれぞれ $79.2 \pm 6.4\%$ ($n = 6$)、 $34.5 \pm 7.1\%$ ($n = 8$) だった (図 3C)。過分極で活性化する I_h は、活性化がおこる膜電位の範囲と電流の反転電位が大きくずれているため、通常は内向きの電流しか観察されず、単純なステップパルスでは反転電位を知ることができない。そこで、異なる二つの保持電位 (-60 及び -130 mV) から各電位へステップパルスを与え、その際発生する I_h を測定することにより、近似的に反転電位を決定した。二つの保持電位からのステップパルスにより発生した電流の instantaneous current の振幅はそれぞれの保持電位での I_h の活性化の程度を反映して、同じ駆動力のかかる膜電位へのステップでも異なる値を取る。反転電位ではこの差 (I_h の活性化の程度の差) が見かけ上見えなくなることを利用し、反転電位の値を近似的に求めた (Mayer and Westbrook 1983)。この方法により決定した I_h の反転電位は標準細胞外液および K-rich 電極内液の条件で -20.3 ± 5.0 mV ($n = 10$) だった。これらの結果から、培養ラット背根神経節において測定される I_h は、反転電位が K^+ の平衡電位より浅く、 Cs^+ に高感受性、 Ba^{2+} には低感受性という基本的な I_h の性質を有していることが確認された。

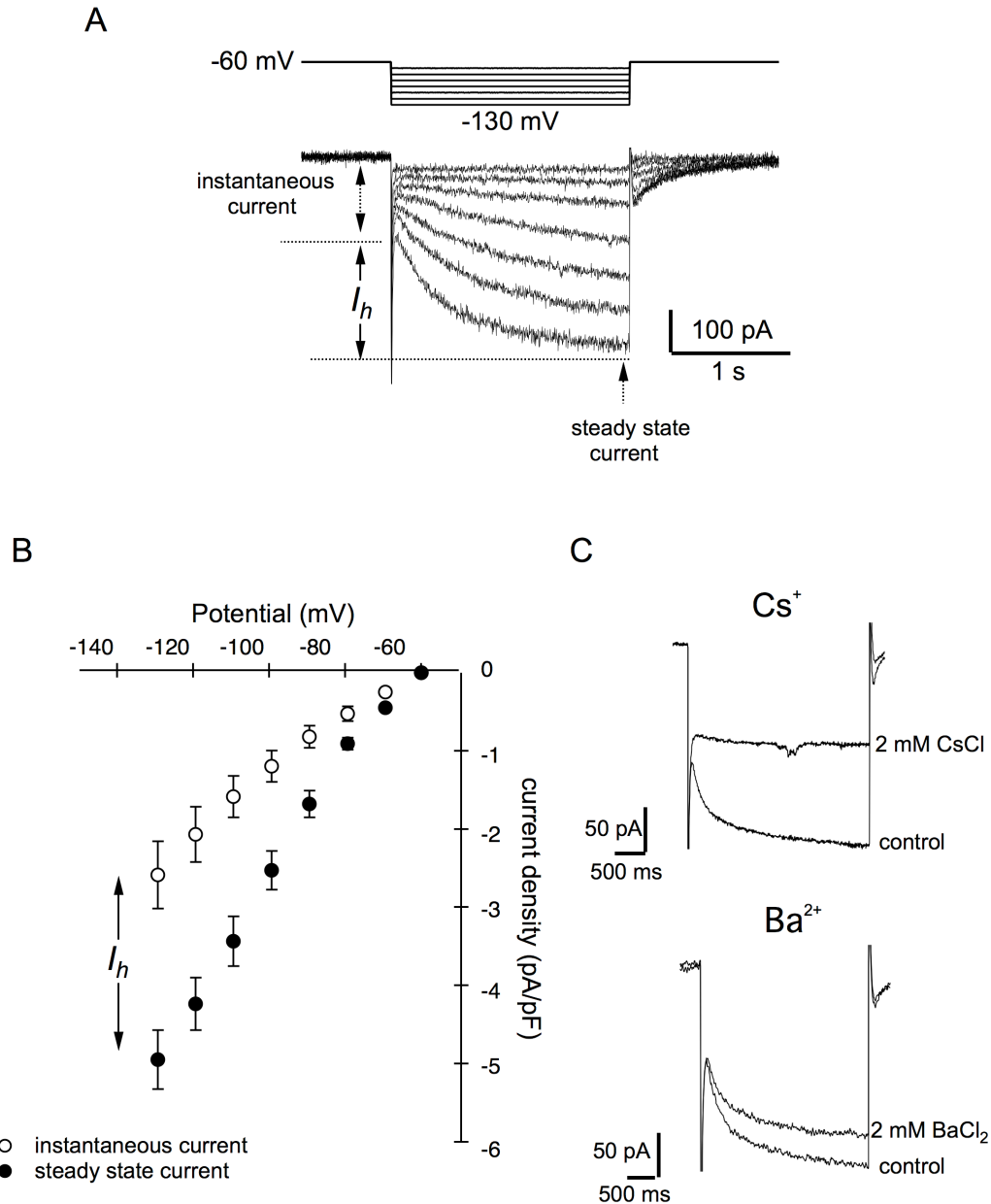


図3 培養ラット背根神経節細胞の過分極活性化陽イオン電流(I_h)の電位-電流関係と薬理学的特徴

- A: ホールセルボルテージクランプ下で保持電位-60 mVから-130 mVまでの過分極パルス (10 mV間隔、上段)を与えた際に発生する過分極活性化陽イオン電流 (I_h)の電流トレース (下段)。過分極パルスを与えた直後の電流をinstantaneous current、パルス終了直前の電流をsteady state currentと定義する。さらに、instantaneous currentとsteady state currentの差分を過分極パルスによって活性化した正味の I_h と定義する。
- B: instantaneous current (○, n=10)及び steady state current (●, n=10)についての電流密度-電圧関係。電流密度は細胞の単位膜容量あたりの電流の振幅 (pA/pF)を示す。
- C: I_h に対する細胞外 Cs^+ 及び Ba^{2+} の効果。細胞外液に 2 mM CsCl 及び BaCl_2 を適用したときの-130 mV への過分極パルスで発生する I_h の電流トレースを示す。

3 I_h の活性化の電位依存性

I_h の活性化の電位依存性を定量的に調べるために、保持電位を-30 mV に設定し、以降の実験を行った。その際、電位依存性のナトリウムチャネル電流、カリウムチャネル電流の混入を最小限に防ぎ、同時に I_h に影響がないように BaCl₂ (0.5 mM)、TTX (0.5 μ M)、4-AP (2 mM)、TEA (3 mM) を細胞外液に添加した条件で実験を行った。

電位固定下で、細胞に図 4 上段に示した 2 段階の矩形波パルスを与え、発生した I_h を解析することにより膜電位に依存した電流の活性化の程度を調べた。細胞に保持電位-30 mV から様々な電位への過分極パルス (1 段目:-10 mV ずつ変化) を I_h を活性化させるのに十分な時間与えた後に、-130 mV までさらに過分極パルスを与えた (2 段目)。2 段目のパルスで発生した電流 (テール電流: I_{tail}) の instantaneous current の大きさの違いは、イオンにかかる駆動力がいずれも一定 (= -130 mV) なので、1 段目のパルスで発生した膜電流の活性化の程度を反映する。これを用いて、各パラメーターを図 4 下段に示したように定義し I_h の活性化の程度を以下のように決定した。

$$\text{activation rate} = \Delta I_{tail} / I_{tailmax}$$

この値を各膜電位に対してプロットし、以下の Boltzmann の式により回帰することで、 I_h の活性化曲線とした。回帰によって得られた V_{half} 及び k (活性化曲線の立ち上がりの急峻さを表す) を I_h の電位依存性を表すパラメーターとして比較検討した。

$$\Delta I_{tail} / I_{tailmax} = (A_{max} - A_{min}) / \{1 + \exp[(V_m - V_{half})/k]\} + A_{min}$$

V_m : 膜電位、 V_{half} : 1/2 の活性化を示す膜電位、 k : slope factor、 A_{max} : 活性化の最大値

A_{min} : 活性化の最小値

上記の方法で I_h の活性化の電位依存性を調べた所、コントロール電極内液 (K-rich 電極内液) を用いた条件で V_{half} 及び k の値はそれぞれ -97.4 ± 1.9 mV、 7.4 ± 0.5 mV ($n = 22$) だった。

I_h の特徴として、cAMP、cGMP などの細胞内サイクリックヌクレオチドによって調節を受けることが知られている (Cardenas *et al.* 1999; Pape 1996; Raes *et al.* 1997)。サイ

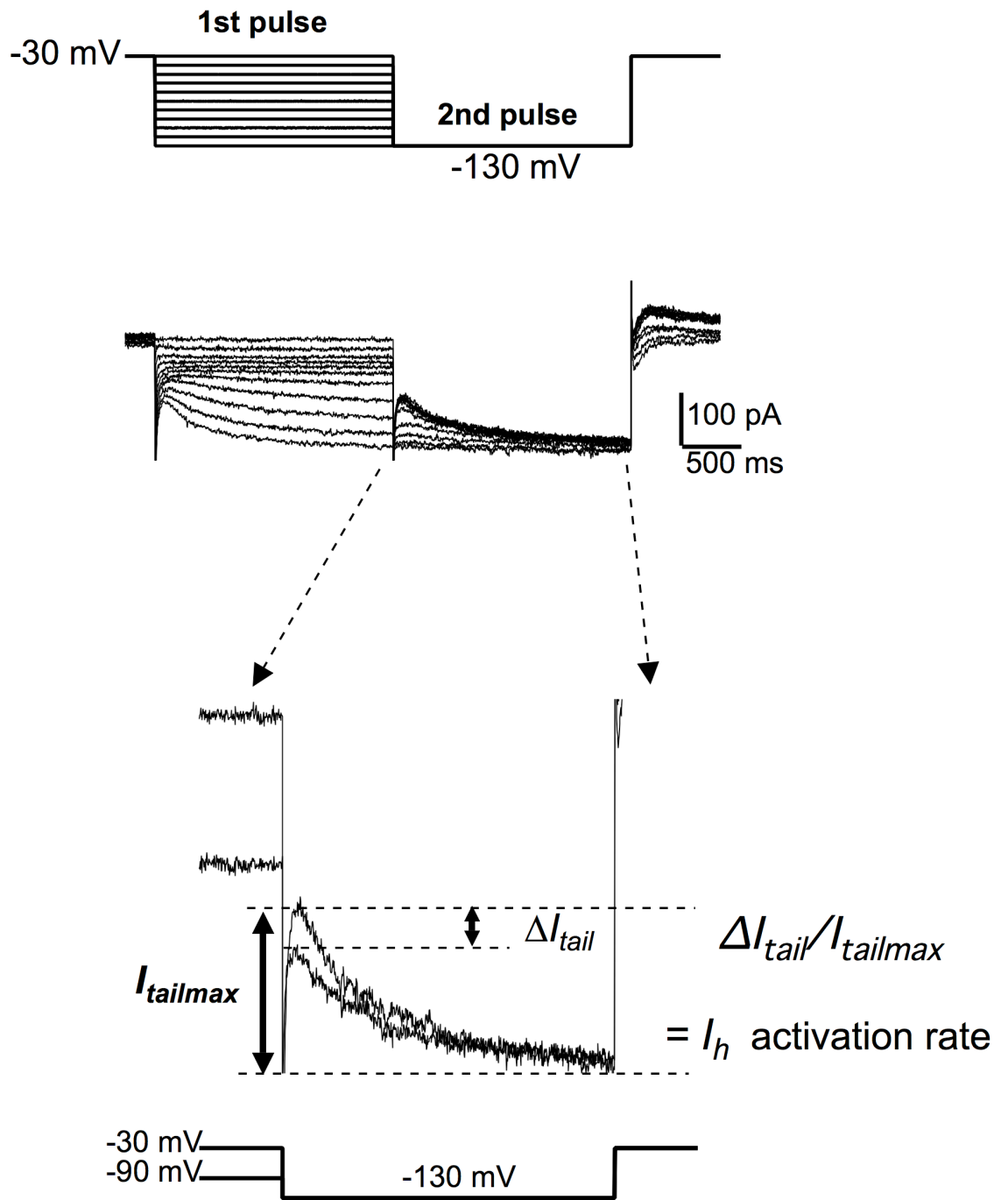


図4 I_h の活性化の電位依存性を調べるために使用した二段パルスプロトコルと典型的な電流トレース

(上段) 二段パルスプロトコル:保持電位-30 mVから-130 mVまで10 mV間隔で過分極パルスを与えた後 (一段目, 1st pulse)、-130 mVへの過分極パルスを与えた (二段目, 2nd pulse)。

(中段) 二段パルスプロトコルによって発生した I_h の典型的な電流トレース。

(下段) I_h のテール電流 (二段目のパルスによって発生した電流)の拡大図。

$I_{tailmax}$: 一段目が-30 mVの時のテール電流

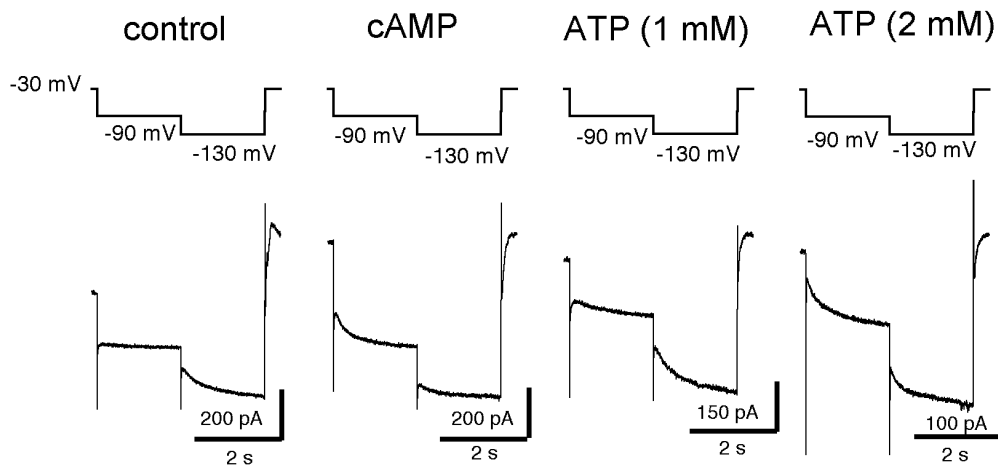
ΔI_{tail} : 各一段目パルス後、発生したテール電流と $I_{tailmax}$ との差

$\Delta I_{tail} / I_{tailmax}$ を I_h の活性化の程度を表す指標 (activation rate)として計算した。

クリックヌクレオチドは一部の例をのぞき I_h のコンダクタンスには影響を与えず、より浅い電位で活性化するように電位依存性を変化させることが報告されている (Pape 1996; Robinson and Siegelbaum 2003)。ラットの背根神経節細胞において、cAMP (1 mM) を添加した電極内液を用いて細胞内を灌流し、 I_h を測定した所、-80~-90 mV の範囲で時間依存性に活性化する成分 (I_h) の振幅の増加が観察された (図 5A)。また、cAMP 存在下で得られた活性化曲線の V_{half} の値は -82.3 ± 2.6 mV ($n = 11$) であり、電位依存性の正の方向へのシフトが見られた (図 5B)。一方、最大活性化時 (-130 mV) の電流密度に有意な変化はなく、コントロール電極内液で -2.3 ± 0.4 pA/pF ($n = 21$)、cAMP 存在下で -3.1 ± 0.6 pA/pF ($n = 11$) だった。これは cAMP が I_h のコンダクタンスに影響を与えずに電位依存性を変化させたことを示している。マウスの背根神経節細胞では細胞内を ATP (5 mM) を含む溶液で灌流することで I_h の活性化の電位依存性が正にシフトすることが報告されている (Raes *et al.* 1997)。培養ラット背根神経節細胞において細胞内を ATP (1 mM) を含む電極内液で灌流しても、ATP 非存在下の条件と比較して活性化の電位依存性に変化はなかった ($V_{half} = -97.6 \pm 2.3$ mV, $n = 10$)。しかし、ATP 濃度を 2 mM に上げると、 V_{half} に近い -90 mV 前後で活性化する I_h の振幅の増大 (図 5A) と活性化曲線のシフトが観察された (-86.8 ± 1.6 mV, $n = 19$, $p < 0.001$, 図 5B)。 V_{half} の値は ATP 濃度を 5 mM まで上げてても 2 mM で得られた値と有意な差はなく ($V_{half} = -88.2 \pm 1.5$, $n = 4$)、活性化曲線のさらなるシフトはなかった (図 6)。また 2 mM ATP は -130 mV における I_h の電流密度には影響を与えなかった (-3.0 ± 0.4 pA/pF, $n = 19$)。

マウスでは ATP が cAMP とは異なる経路で I_h を活性化し、cAMP による活性化からさらに正の方向に活性化曲線のシフトを起こすことが報告されている (Raes *et al.* 1997)。しかし、培養ラット背根神経節細胞では cAMP と ATP の組み合わせ (cAMP = 1 mM, ATP = 2 mM) は cAMP 単独、2 mM ATP 単独の条件と比較して V_{half} の値に有意な差はなく、活性化曲線の更なるシフトは見られなかった (-86.0 ± 2.0 mV, $n = 6$, 図 6)。また同様の目的で膜透過性の cAMP 類似物質の細胞外液への添加を行ったが、今回の実験系では、細胞内 ATP

A



B

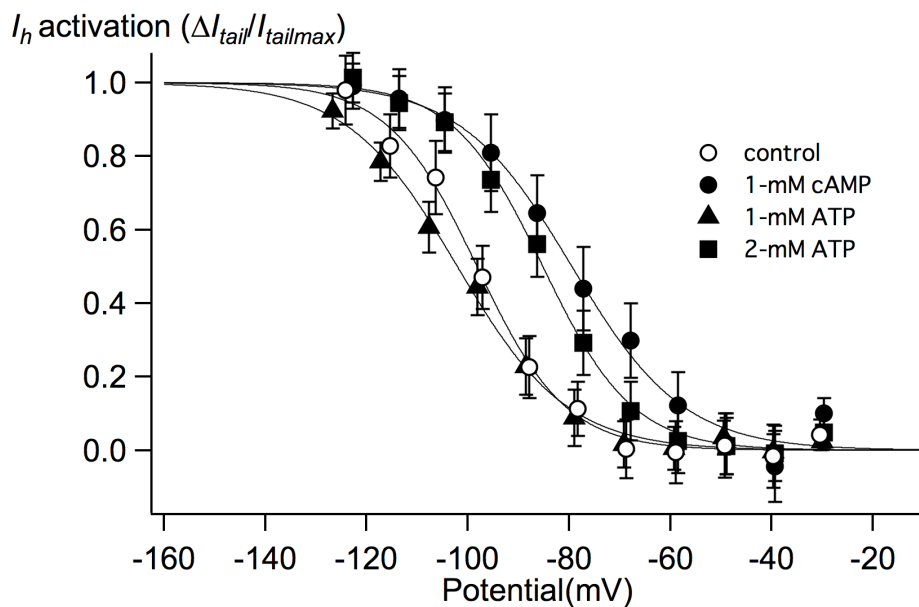


図5 ラット背根神経節細胞における I_h に対する細胞内cAMP及びATPの効果

A: 保持電位-30 mVから-90 mVへの過分極パルスを与えた後に-130 mVへ過分極させたときに発生する I_h の電流トレース。

コントロール及び電極内液にそれぞれ1 mM cAMP、1 mM ATP、2 mM ATPを添加した時の典型例を示した。測定は I_h 以外の電流の影響を最小限にするためBaCl₂ (0.5 mM)、4-AP (2 mM)、TEA (3 mM)、TTX (0.5 μM)を細胞外に適用した条件で行った。

B: ラット背根神経節細胞における I_h の活性化曲線。

コントロール(○, n = 22)および1 mM cAMP (●, n = 11)、1 mM ATP (▲, n = 11)、2 mM ATP (■, n = 19)を電極内液に添加した時のそれぞれの活性化曲線を示した。

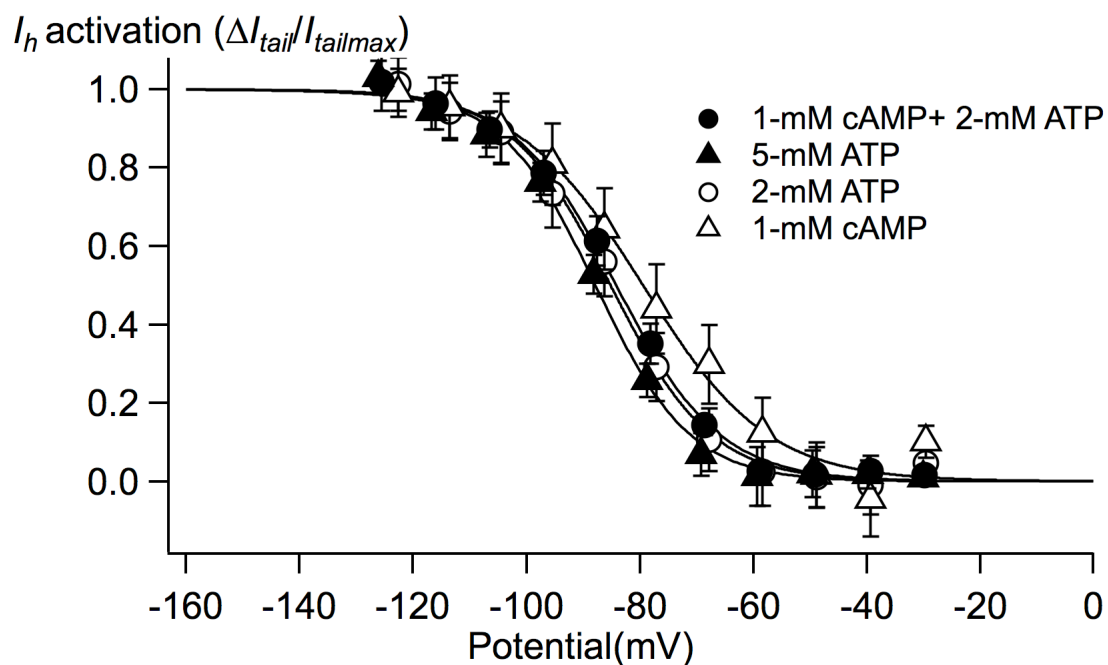


図6 ラット背根神経節細胞における I_h の電位依存性に対する5 mM ATP及びcAMP(1 mM)とATP (2 mM)の同時添加の効果

ピペット内液に1 mM cAMPと2 mM ATP (●) を同時にピペット内液に加えた条件及び5 mM ATP (▲)を加えた条件での、それぞれの I_h の活性化曲線を示した。比較のため図5Bに示した、2 mM ATP (○)及び1 mM cAMP (△)存在下での I_h の活性化曲線を併記した。

の有無にかかわらず、dibutyryl-cAMP、8-bromo-cAMP、8-CPT-cAMP のいずれの類似物質も 1～5 mM の範囲の濃度では効果を示さなかった。

4 細胞内 ATP 存在下での I_h の電位依存性に対するアデニル酸シクラーゼ阻害薬の効果

マウスでの報告とは異なり、ラットの背根神経節細胞では I_h の電位依存性を十分にシフトさせる濃度の cAMP が存在する条件では、細胞内 ATP は I_h に対して電位依存性の更なるシフトを引き起こすような作用は示さなかった。ラット背根神経節の I_h が cAMP で調節を受けることは上述したように明らかであり、ATP による調節のメカニズムとして、ATP を基質としたアデニル酸シクラーゼによる細胞内 cAMP 濃度の上昇による調節の可能性が考えられる。そこで、アデニル酸シクラーゼの阻害薬である MDL-12,330A 及び SQ 22,536 を用いてこの可能性を検討した。アデニル酸シクラーゼの賦活薬であるフォルスコリンを細胞外液に適用すると、-70～-90 mV の範囲で活性化する I_h の振幅が $29.1 \pm 9.0 \%$ ($n = 6$) 上昇した。この結果から、ラット背根神経節細胞の I_h はアデニル酸シクラーゼの活性化により調節を受け得ることが確認された。MDL-12,330A を細胞外液に添加し I_h を測定した所、コントロール電極内液、cAMP (1 mM)、ATP (2 mM)、いずれの条件でも過分極によって活性化する I_h に相当する成分が消失した (図 7)。この効果はヌクレオチドの有無にかかわらず引き起こされたことから実際の機序は不明だが非特異的な、少なくともアデニル酸シクラーゼの阻害とは異なる作用によると思われる。フォルスコリンと SQ 22,536 (100 μ M) を同時に適用すると上記のフォルスコリンの効果は消失し、 I_h の振幅の上昇は見られなかった。この結果から、100 μ M の SQ 22,536 の適用によって背根神経節細胞のアデニル酸シクラーゼの活性を阻害しうることが確認された。そこで同一細胞から SQ 22,536 非存在下及び SQ 22,536 (100 μ M) 存在下で I_h を測定し (二段階パルス)、活性化の電位依存性を調べた。ATP (2 mM) 存在下での SQ 22,536 適用前の I_h の V_{half} は -90.4 ± 1.7 mV ($n = 8$)、適用後の V_{half} は -91.5 ± 1.2

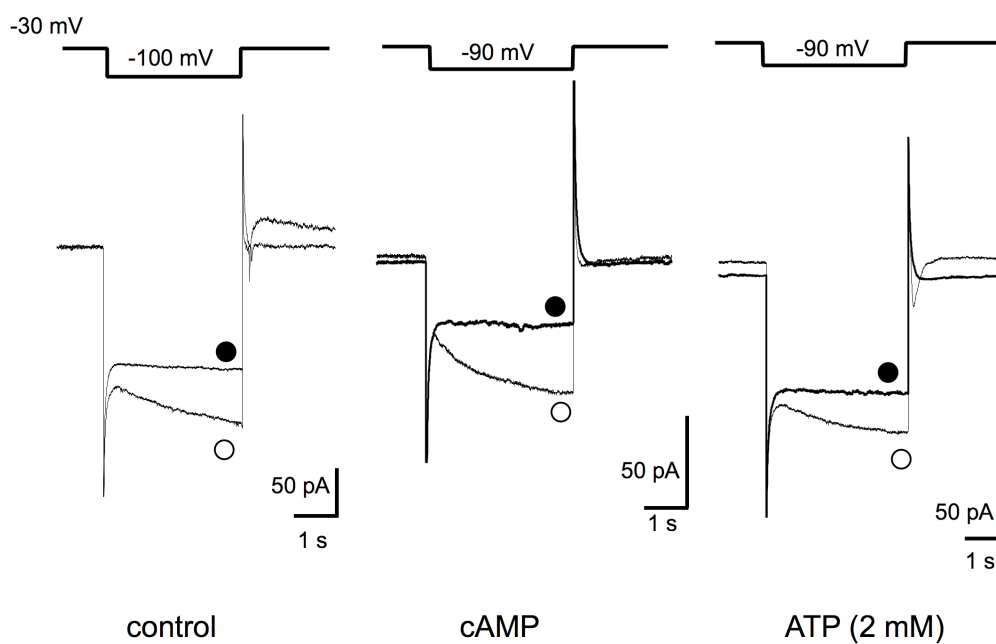


図7 ラット背根神経節細胞における I_h に対するMDL-12,330Aの効果

細胞外液中にMDL-12,330A (100 μ M)を適用する直前(○)及び適用60秒後 (●) の典型的な I_h のトレースを示した。保持電位-30 mVから-100 mV (コントロール)又は-90 mV (1mM cAMP及び2 mM ATP)への過分極パルスを与え、経時的に電流を観察した。

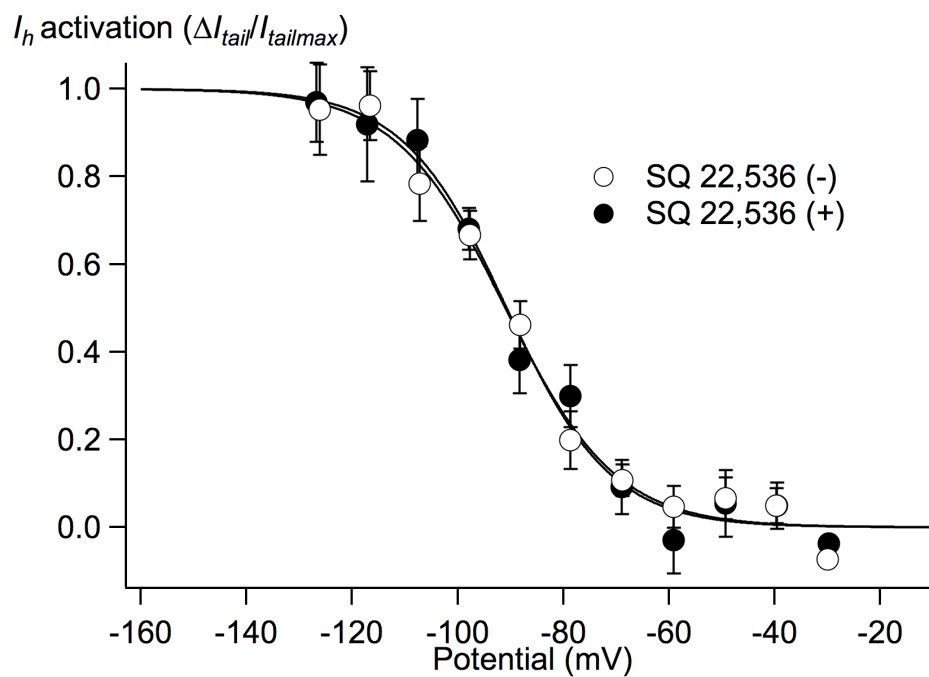


図8 細胞内ATP存在下での I_h の電位依存性に対するアデニル酸シクラーゼ阻害薬 (SQ22,536)の効果

細胞内ATP (2 mM)存在下での細胞外液中へのSQ22,536 (100 μ M)適用前 (○, n = 8)及び適用後 (●, n = 8)の I_h の活性化曲線を示す。

mV ($n = 8$)だった。SQ 22,536 の適用の前後で I_h の V_{half} の値に有意な変化は見られなかった ($p = 0.58$, 図 8)。

5 I_h の活性化の電位依存性に対する ATP 非加水分解性類似物質の効果

ATP の I_h に対する効果について、ATP の加水分解を介したメカニズムの関与の可能性をさらに検討するために、ATP の非加水分解性の類似物質である ATP- γ -S (2 mM) および AMP-PNP (2 mM) を細胞内液に添加して I_h を測定し、その効果を調べた。AMP-PNP の効果は、Li 塩の AMP-PNP を使用したので、コントロール電極内液に LiCl 6.4 mM を添加したものを対照として比較した。 I_h の電流密度及び電位依存性は添加した濃度の LiCl による影響を受けないことをあらかじめ確認した。図 9A に示したように、ATP 同様 AMP-PNP を含む条件では、コントロールに比べて -90 mV 前後で活性化する I_h の振幅の上昇が観察された。また、-130 mV での I_h の電流密度は AMP-PNP 存在下で -2.1 ± 0.5 pA/pF ($n = 5$)、コントロール (含 LiCl) で -2.6 ± 0.5 pA/pF ($n = 5$) と有意な差はなかった。一方で、 I_h の活性化の電位依存性には有意な変化が見られ、 V_{half} はコントロールで -99.05 ± 0.5 mV ($n = 10$)、AMP-PNP 存在下で -89.6 ± 1.0 mV ($n = 5$) と約 10 mV のシフトが見られた ($p < 0.01$, 図 9B)。さらに ATP- γ -S でも同様に電流密度 (-130 mV) を変えずに電位依存性をシフトさせるという ATP の効果を模倣する結果が得られた ($V_{half} = -91.3 \pm 3.9$ mV, $n = 5$, $p < 0.01$, 図 9B)。ATP- γ -S 存在下での電流密度は -3.5 ± 0.6 pA/pF、非存在下での電流密度は -3.4 ± 1.7 pA/pF であり両者の値に有意な差はなかった ($p = 0.98$)。

6 細胞内 ATP による I_h の活性化作用に対するプロテインキナーゼ阻害剤の効果

I_h または I_f の cAMP による調節に関して、PKA によるリン酸化を介したメカニズムを示唆する報告がある (Abi-Gerges *et al.* 2000; Chang *et al.* 1991; Tokimasa and Akasu 1990; Yu *et al.* 1995)。ATP の I_h に対する効果について、リン酸化の関与の可能性を調べる

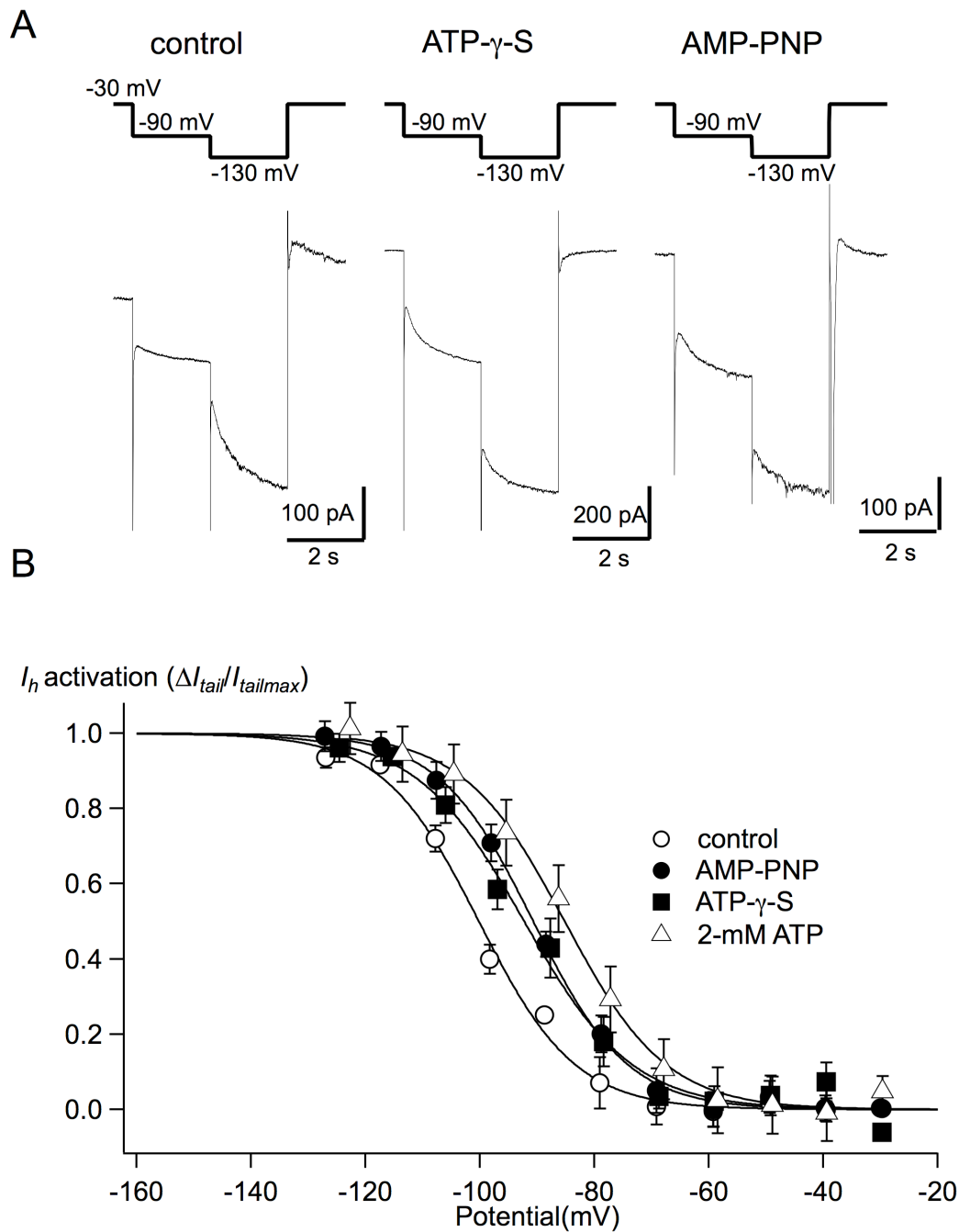


図9 ラット背根神経節細胞における I_h の電位依存性に対する非加水分解性ATP類似物質の効果

A: 保持電位-30 mVから-90 mVへの過分極パルスを与えた後に-130 mVへ過分極させたときに発生する I_h の電流トレース

コントロール電極内液及び電極内液にそれぞれ2 mM ATP- γ -S、2 mM AMP-PNPを添加した時の典型例を示した。

B: コントロール電極内液 (○, $n = 10$)および2 mM AMP-PNP (●, $n = 5$)、2 mM ATP- γ -S(■, $n = 5$)を電極内液に添加した時の I_h の活性化曲線を示した。比較のため図5で示した2 mM ATPの活性化曲線 (△, $n = 19$)も付記した。

ため、PKA の特異的阻害剤の H-89 の I_h に対する効果を調べた。培養中の背根神経節細胞の培養液を H-89 (100 μ M) を添加した培養液に交換した後、CO₂ インキュベーターに戻し、1 時間後実験に使用した (H-89 処理)。さらに H-89 処理した細胞から I_h を測定する際には、細胞外液中にも同濃度の H-89 を添加した条件で実験を行った。H-89 で前処置した細胞から測定した I_h の電流密度は ATP 非存在下及び存在下でそれぞれ、 -1.6 ± 0.2 pA/pF ($n = 7$)、 -2.0 ± 0.4 pA/pF ($n = 5$) で、前処置の有無による有意な差は見られなかった。また図 10 で示すように、ATP 存在下での I_h の活性化曲線のシフトは H-89 処理の影響を受けなかった。H-89 で前処置した細胞から得られた I_h の V_{half} 及び k はコントロール電極内液使用時でそれぞれ -91.2 ± 1.5 mV、 8.3 ± 0.8 mV ($n = 7$)、ATP (2 mM) 存在下で -80.3 ± 2.6 mV、 9.8 ± 1.3 mV ($n = 5$) だった。 V_{half} の値は有意にシフトし ($p < 0.01$)、 k の値に有意な差はなかった ($p = 0.28$, 図 10 下段)。また、H-89 未処理の条件でのコントロール電極内液と ATP (2 mM) 含電極を用いた際の V_{half} と k の値はそれぞれ -93.4 ± 2.0 mV、 9.8 ± 2.1 mV ($n = 7$)、 -84.3 ± 2.2 mV、 8.5 ± 1.1 mV ($n = 6$) であり、H-89 処理細胞からそれぞれの電極内液を用いて得られた値との有意な差はなかった (図 10 上段)。

7 Cs-rich 電極内液使用時の I_h の電気生理学的性質

ラットの知覚神経節細胞の電位依存性カルシウムチャネル電流は PKA による調節を受けることが報告されている (Gross et al. 1990)。以降の実験では、 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。

電位依存性カルシウムチャネル電流は脱分極によって活性化するため、同様に脱分極によって活性化するカリウム電流 (外向き) の混入を最小限にするために電極内液は K^+ を Cs^+ に置換した組成のもの (Cs-rich 電極内液) を用いた。実験条件として、細胞内 Cs^+ 又は低 K^+ 濃度

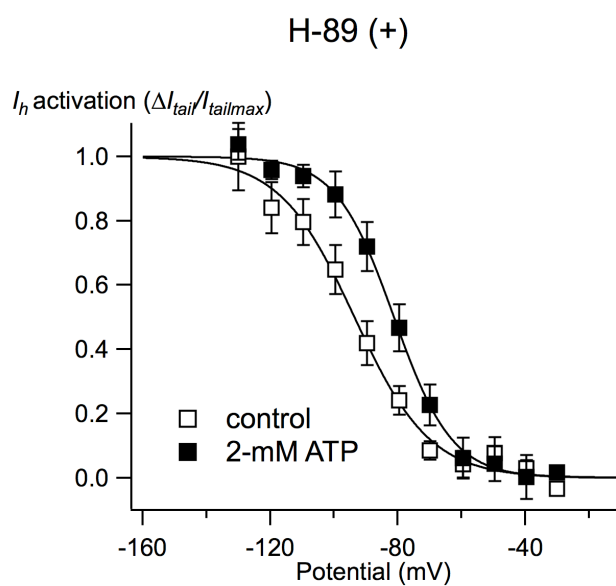
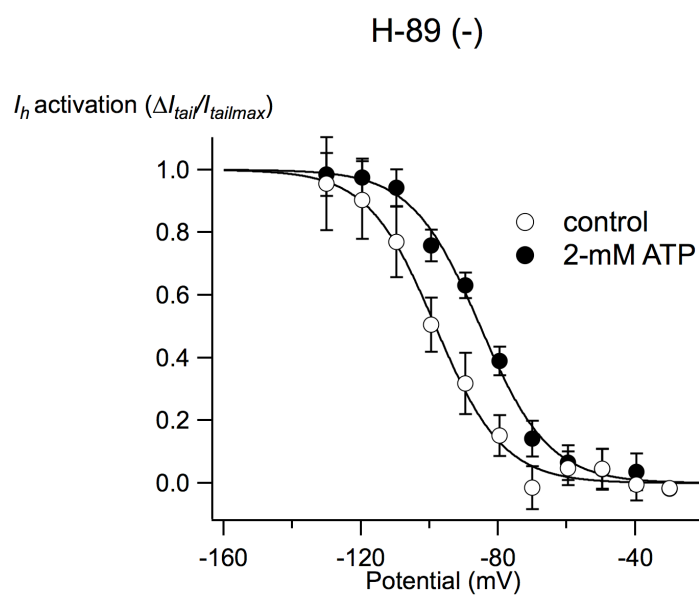


図10 細胞内ATPによる I_h の活性化作用に対するプロテインキナーゼ阻害剤 (H-89)の効果
 事前に培養液へH-89 (100 μ M)を添加し、一時間インキュベーションした後、H-89 (100 μ M)存在下で測定を行った細胞 (H-89処理細胞、下段)とH-89未処理の細胞 (上段)から得られた I_h の活性化曲線。それぞれの条件でコントロール電極内液 (○ ; $n = 7$, □ ; $n = 7$)、2 mM ATP 電極内液(● ; $n = 6$, ■ ; $n = 5$)を使用した時の活性化曲線を示す。

による I_h への影響の有無を知るため、Cs-rich 電極内液使用時における I_h の電気生理学的性質を確認した。Cs-rich 電極内液を用いて保持電位 -30 mV に電位固定し、-130 mV、4 s 間の過分極パルスを与えると K-rich 電極内液使用時と同様、比較的ゆっくりと活性化する内向き電流、 I_h が見られた (図 11A)。図 11B に Cs-rich 電極使用時の正味の I_h (instantaneous current と steady state current の差分) の電流電圧関係を示した。-130 mV における電流密度は -2.1 ± 0.4 pA/pF (膜容量: 60.9 ± 6.4 pF, $n = 15$) だった。Cs-rich 電極内液を用いた際の I_h の反転電位を K-rich 電極内液と同じ方法を使って決定しようと試みたが、保持電位 -130 mV からのステップによって発生した instantaneous current は直線にはならず、近似によって正確な反転電位の値を求めることはできなかった。続いて Cs-rich 電極内液を使用した条件での I_h の活性化の電位依存性を調べた。Cs-rich 電極内液(コントロール)では I_h の V_{half} および k は -112.5 ± 1.5 mV、 6.9 ± 0.6 mV ($n = 15$) であり、 V_{half} の値は K-rich 電極内液を用いた場合と比べて約 10 mV 過分極方向にシフトしていた。しかし、ATP (2 mM) を電極内液に添加すると、K-rich 電極内液を使ったときと同様、 I_h の V_{half} は約 10 mV 脱分極方向にシフトした ($V_{half} = -100 \pm 1.5$ mV, $n = 13$, 図 11C)。この結果は Cs-rich 電極内液を用いた条件でも、少なくとも I_h の ATP による調節に関しては K-rich 電極内液を用いた条件と同様に維持されていることを示している。

強制発現させた HCN チャネルは発現させたサブタイプの種類、組み合わせによって、測定される HCN 電流の活性化の時間経過が異なることが知られている。そのため、活性化の時間経過は I_h を特徴付ける重要な電気生理学的なパラメーターの一つとなっている (Kaupp and Seifert 2001)。そこでラットの背根神経節細胞での I_h について、電流トレースを二次指数関数で回帰し、活性化の時間経過の時定数をもとめた (図 12A)。K-rich 電極内液を用いた実験では -130 mV で $\tau_{fast} = 0.37 \pm 0.04$ s、 $\tau_{slow} = 2.1 \pm 0.2$ s ($n = 52$, 図 12B) だった。一方で Cs-rich 電極内液では $\tau_{fast} = 0.5 \pm 0.1$ s、 $\tau_{slow} = 2.8 \pm 0.3$ s ($n = 10$, 図 12B) だった。二つの条件でそれぞれの値の間に有意な差はなかった。さらにより長い持続時間 (8 s) の過分極パルス (-130 mV) で活性化した I_h の時定数についても調べたが、K-rich 電極内液使用

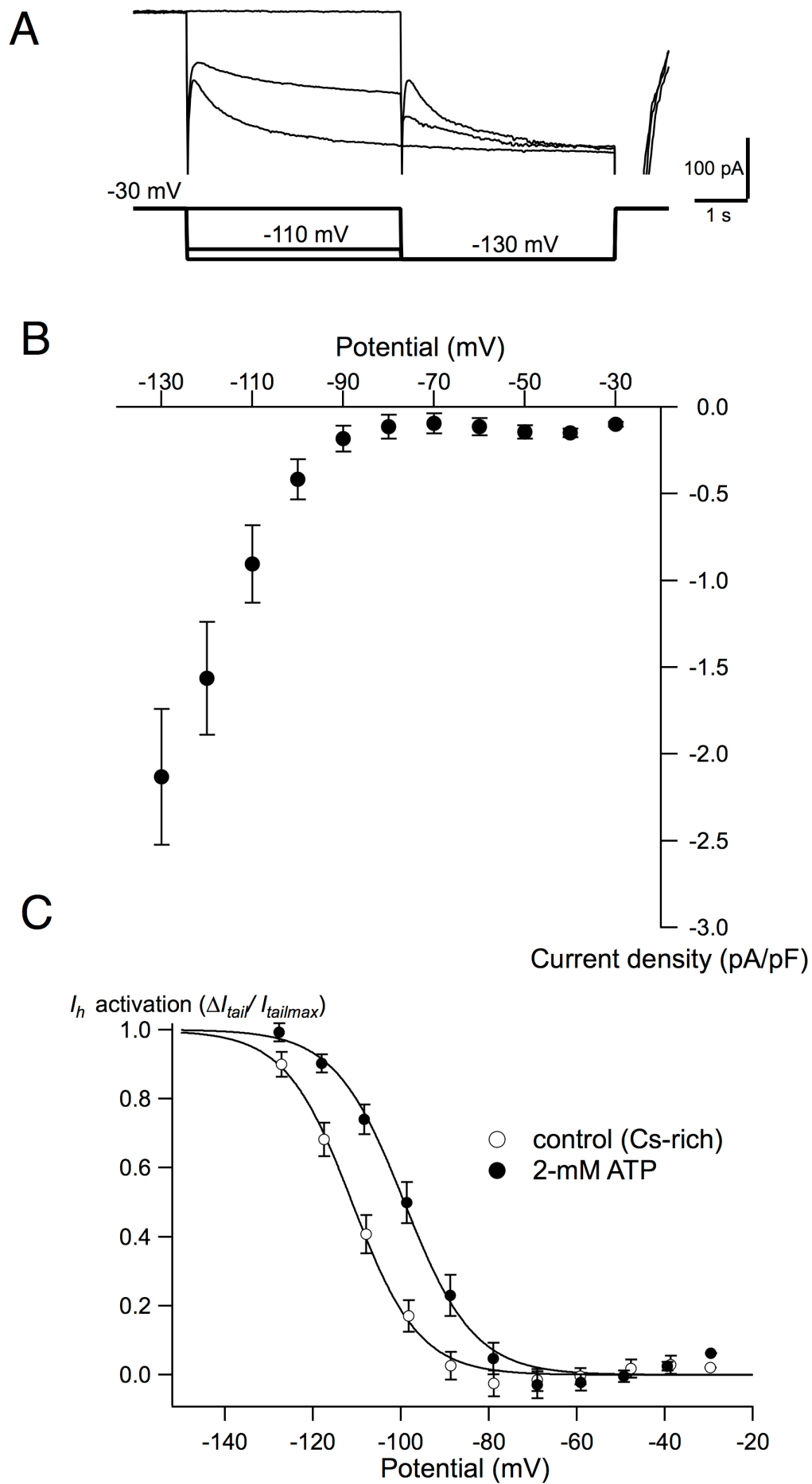


図11 Cs-rich電極内液 (低 K^+ 濃度電極内液)使用時の I_h の電気生理学的性質

A: Cs-rich電極内液を使用したときの I_h の電流トレース

保持電位-30 mVから-110 mVまたは-130 mVへの過分極パルスを与えた後、さらに-130 mVに保持したときの典型例を示した。細胞外液中には $BaCl_2$ (0.5 mM)、4-AP (2 mM)、TEA (3 mM)、TTX (0.5 μ M)を含む。

B: I_h の電流-電圧関係。 過分極パルスによって時間依存性に活性化した成分について

細胞膜容量あたりの電流密度を膜電位に対してプロットした ($n = 10$)。

C: Cs-rich電極内液使用時の I_h の活性化の電位依存性。 電極内液中にATPを加えていない条件 (○, $n = 13$)と 2 mM ATP存在下 (●, $n = 15$)で得られた I_h の活性化曲線を示した。

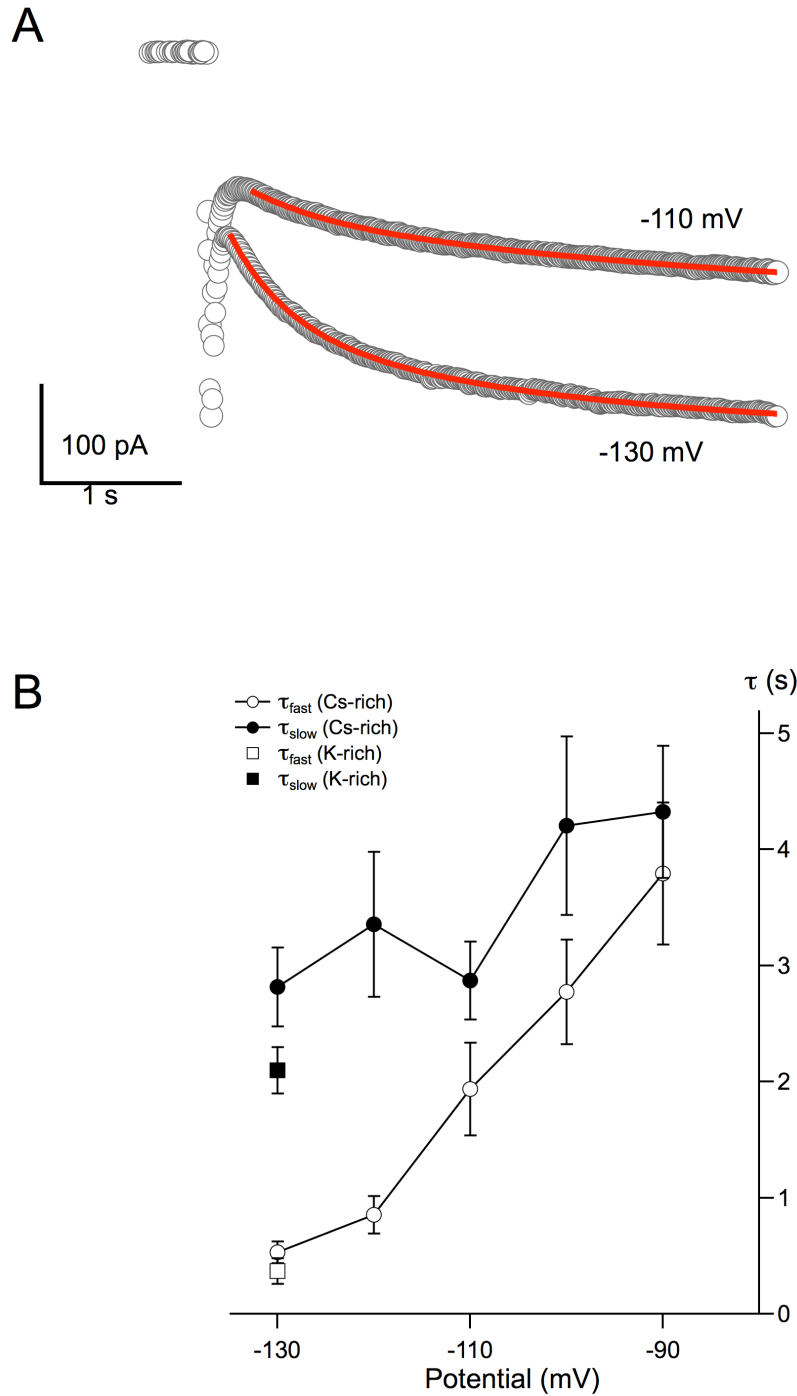


図12 Cs-rich電極内液使用時の I_h の活性化の時間経過

A: 過分極パルスを与えたときの I_h の活性化の時間経過を定量化するために電流トレースを二次指数関数で近似し、活性化の時定数 (τ)を求めた。図は-110 mV及び-130 mVへの過分極パルスによって活性化した実際の電流トレース(○)の典型例と近似曲線(赤線)を示した。

B: Cs-rich電極内液使用時の I_h の活性化の時間経過の時定数の早い成分 (τ_{fast} , ○ ; $n = 10$)と遅い成分 (τ_{slow} , ● ; $n = 10$)をそれぞれ膜電位についてプロットした。比較のためK-rich電極内液使用時の-130 mVでの時定数、 τ_{fast} (□, $n = 52$)、 τ_{slow} (■, $n = 52$)も同時にプロットした。

時で、 $\tau_{\text{fast}} = 0.28 \pm 0.03 \text{ s}$ 、 $\tau_{\text{slow}} = 2.2 \pm 0.2 \text{ s}$ ($n = 24$)、Cs-rich 電極内液使用時で $\tau_{\text{fast}} = 0.35 \pm 0.09 \text{ s}$ 、 $\tau_{\text{slow}} = 2.3 \pm 0.2 \text{ s}$ ($n = 16$)とやはり両者の値に有意な差はなかった。最大に活性化した際の活性化の時間経過は Cs-rich 電極内液に影響されないことが確認された。

以降の実験では、コントロール電極内液として Cs-rich 電極内液に 100 μM ATP を加えたものを実験の対照として使用した。100 μM の ATP では I_h の V_{half} の値に影響がないことはあらかじめ確認した ($V_{\text{half}} = -110 \pm 1.6 \text{ mV}$, $n = 6$)。

8 ラット背根神経節細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流の振幅の経時的変化に対する細胞内 ATP の効果

Cs-rich 電極内液を用いて電位依存性のカルシウムチャネル電流の測定を行った。ラット背根神経節細胞を電位固定後、保持電位-80 mV から-10 mV まで脱分極させると電位依存性のナトリウムチャネルとカルシウムチャネルによる非常に大きな内向き電流が観察された。細胞外液を 0.5 μM の TTX と 5 mM BaCl_2 を含む低 Na^+ 細胞外液に交換すると、TTX 感受性の電位依存性ナトリウムチャネル電流の消失と、TTX 非感受性の電位依存性ナトリウムチャネル電流の減少が見られた。電位依存性カルシウムチャネル電流の振幅はバリウムへの置換によって若干増大した。バリウム電流 (I_{Ba})はパッチ膜を破りホールセル記録による測定を確立した後、約 2 分後から 20 s 間隔で継続的に測定した。残存した TTX 非感受性の電位依存性ナトリウムチャネル電流の影響を最小限にするため振幅はピークではなくパルス開始後 40 ms の値を計測した。コントロール電極内液 (Cs-rich 電極内液)を用いた場合、 I_{Ba} の振幅は時間経過とともに徐々に減少していく傾向が見られた (rundown, 図 13A, B)。測定開始から 340 s 後には I_{Ba} の振幅は測定開始直後の $41.9 \pm 4.9 \%$ まで減少した (図 13B)。また、340 s 後に L 型カルシウムチャネル抑制薬である nifedipine (1 μM) を適用したところ、 I_{Ba} の振幅が測定開始直後の振幅の大きさに対して $9.3 \pm 1.1\%$ 減少した (rundown は継続しているため nifedipine 適用後 60 s 後の振幅で評価した)。2 mM の ATP を電極内に入れて I_{Ba} を測定す

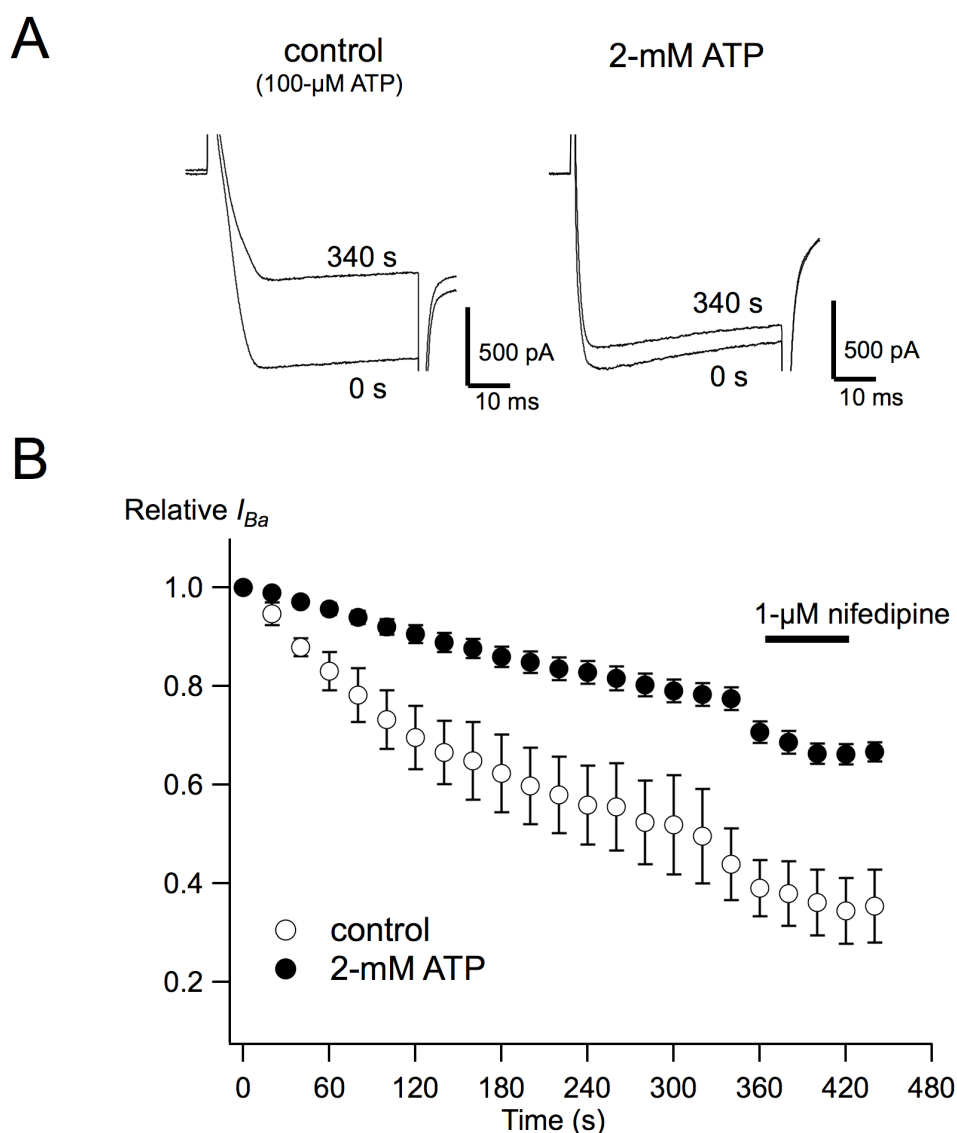


図13 ラット背根神経節細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流の振幅の経時的変化に対する細胞内ATPの効果

A: 5 mM BaCl_2 存在下で保持電位-80 mVから-10 mVへの脱分極パルス (持続時間50 ms)を与え、バリウム電流 (I_{Ba})として電位依存性カルシウムチャネル電流を測定した。脱分極パルスは20 s間隔で与え、経時的に振幅の変化を観察した。異なる電極内液を使用した際の測定開始時 (0 s)と340 s後の典型的な電流トレースを示した。

B: I_{Ba} の振幅の経時的変化。測定開始直後 (0 s)の振幅に対する割合として、コントロール電極内液使用時 (○, $n = 11$), 電極内液に2 mM ATPを加えた条件 (●, $n = 19$)での I_{Ba} の振幅の変化をプロットした。 I_{Ba} の振幅は脱分極パルス開始後40 msの値を使用した。すべての条件で図中に横線で表示した時間nifedipine (1 μM)を適用した。

ると、振幅の減少傾向はコントロール電極内液使用時と同様に見られたが、その大きさは大幅に減少した。340 s 後の振幅は測定開始直後に対して、 $77.5 \pm 2.4\%$ ($n = 19$)に維持されており、コントロールに比べて有意に大きかった (図 13A, B)。ATP 存在下での nifedipine の抑制率は $11.3 \pm 1.7\%$ ($n = 19$)で、コントロールとの有意な差はなかった ($p = 0.43$)。これは、 I_{Ba} の rundown と nifedipine による I_{Ba} の抑制がオーバーラップしたことにより、厳密に nifedipine の効果だけを評価できなかったためによると思われる。

9 電位依存性カルシウムチャネル電流に対するプロテインキナーゼ A 阻害剤の効果

ATP 存在下で見られた I_{Ba} の rundown の抑制に対する PKA の関与の有無を PKA の阻害剤である H-89 を用いて調べた。100 μM の H-89 を細胞外に適用すると I_{Ba} の振幅は直後から急速に減少し、60s 後ほぼ消失した。濃度を 10 μM にしても同様に I_{Ba} の振幅の減少が見られ (図 14)、60s 後に残った I_{Ba} は適用直前の $8.8 \pm 5.4\%$ ($n = 3$)だった。また、H-89 のプロテインキナーゼ阻害活性のない類似物質である H-85 (10 μM)の適用でも同じ現象が見られた ($35.1 \pm 1.1\%$, $n = 4$, $t = 60$ s, 図 14)。この結果から、 I_{Ba} の H-89 による振幅の大幅な減少はプロテインキナーゼ阻害による作用ではなく何らかの非特異的な作用によるものと思われる。次に、PKA 阻害ペプチド (PKI, $K_i = 2.5$ nM)を電極内液へ添加し、ATP による I_{Ba} の rundown 抑制に対する PKA の関与を調べた。ATP を入れた電極内液に PKI を 0.1、1、5 μM の濃度で加え、 I_{Ba} を測定し振幅の時間経過を観察した (図 15)。各濃度の PKI 存在下での 340 s 後の振幅はそれぞれ測定開始直後に対して、 $83.0 \pm 4.6\%$ (0.1 μM , $n = 4$)、 $79.9 \pm 6.7\%$ (1 μM , $n = 4$)、 $76.7 \pm 4.1\%$ (5 μM , $n = 6$)だった。いずれの値も ATP 単独と比べて有意な差はなかった。しかし、PKI の濃度を 50 μM まで上げると振幅の減少量の若干の増大が見られ、340 s 後の振幅の減少は $67.3 \pm 3.9\%$ ($n = 9$)まで達し、ATP 単独に比べて有意に減少した ($p < 0.05$, 図 15)。PKI (50 μM)存在下での nifedipine の抑制率は $7.8 \pm 0.1\%$ ($n = 9$)で、有意な変化は認められなかった ($p = 0.21$)。

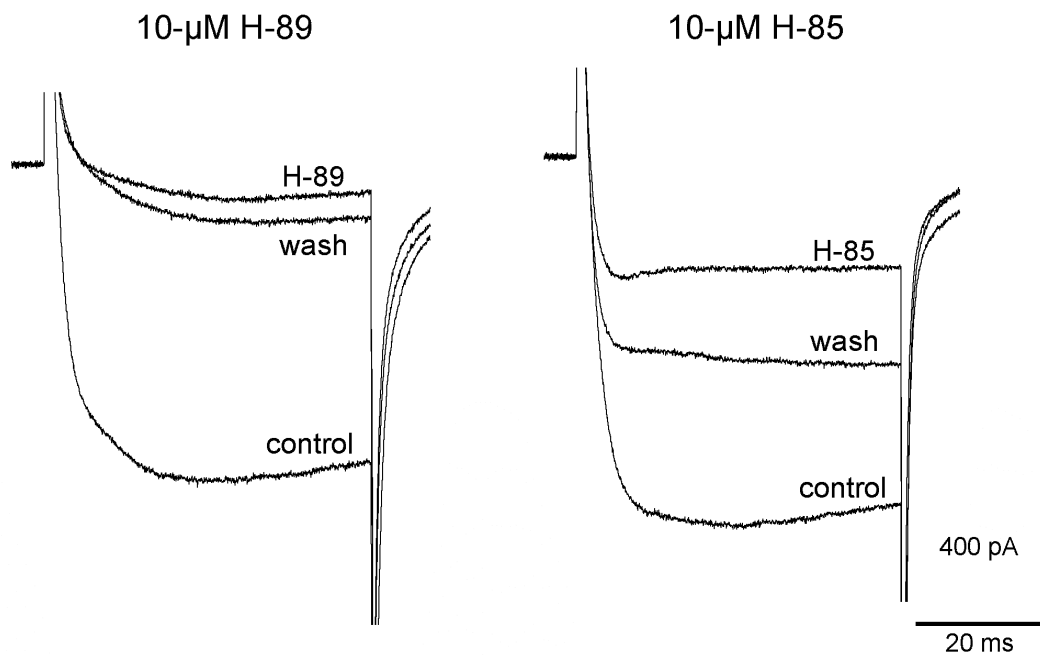


図14 電位依存性カルシウムチャネル電流に対するH-89の効果

ラット背根神経節細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流に対して細胞外液中にH-89 (10 μ M)およびH-85 (10 μ M)を適用したときの典型的な電流トレース。保持電位-80 mVから-10 mVへの脱分極パルスで20 s間隔で与え経時的に電流を観察した。

Relative I_{Ba}

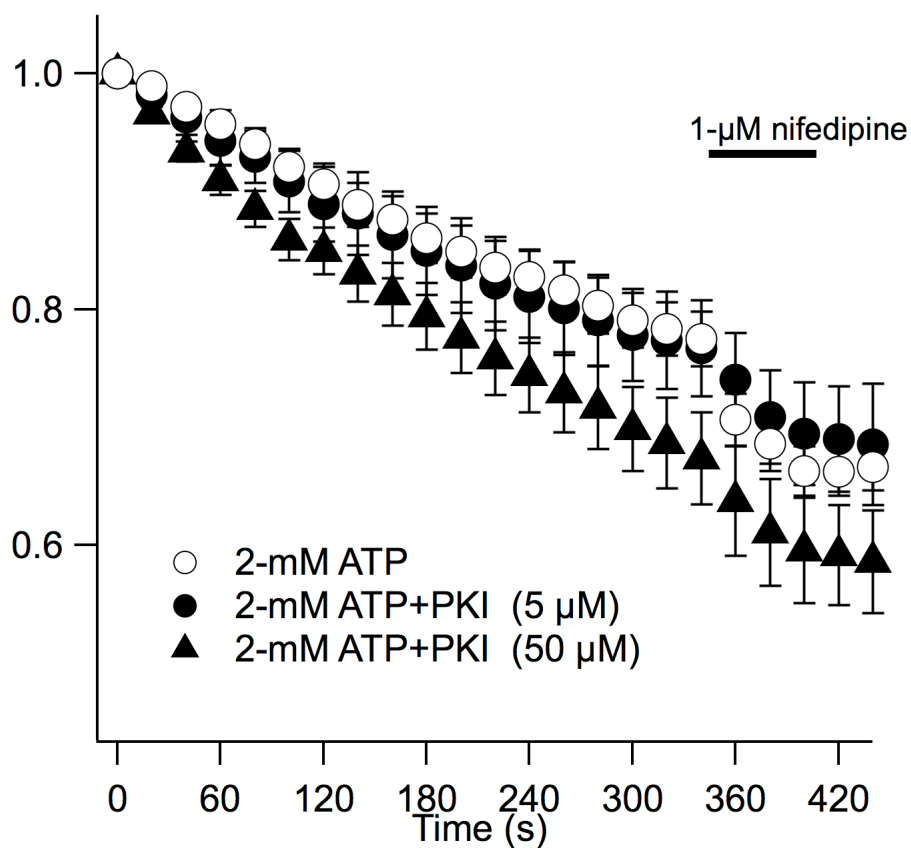


図15 細胞内ATP (2 mM)存在下での I_{Ba} の振幅の経時的変化に対するプロテインキナーゼ阻害ペプチド (PKI)の効果

電極内液にATP (2 mM)を加えた条件 (○、n = 19)、ATP (2 mM)と PKI (5 μ M)を加えた条件 (●、n = 6)及びATP (2 mM)と PKI (50 μ M)を加えた条件 (▲、n = 9)で測定した I_{Ba} の振幅の経時的変化を示した。すべての条件で図中に横線で表示した時間に nifedipine (1 μ M)を適用した。

10 細胞内 ATP の I_h の電位依存性への効果に対する PKI の作用

細胞内 ATP による I_h の電位依存性に対する効果への、内因性 PKA の関与の有無を検証するために、 I_{Ba} の測定において有意な効果が認められた 50 μ M の PKI 存在下で I_h を測定し、ATP による I_h 調節への影響を調べた。ATP (2 mM) と PKI をともに電極内液に入れた条件での I_h の活性化曲線を図 16 に示した。 I_h の活性化の V_{half} と k はそれぞれ、 -97.9 ± 1.9 mV、 8.0 ± 1.2 mV ($n = 6$) であり、ATP 単独 (PKI 非存在下) での値 ($V_{half} = -97.6 \pm 1.1$ mV, $k = 7.4 \pm 0.6$ mV, $n = 7$) と比べて有意な変化は見られなかった ($p = 0.86$)。

11 I_h の活性化の電位依存性に対する PKA 触媒サブユニットの効果

ラットの嗅覚受容体の I_h 及び強制発現させた HCN4 チャンネルではパッチ電極内への PKA の触媒サブユニット (PKAc) の添加によって I_h の活性化が引き起こされることが報告されている (Liao et al. 2010; Vargas and Lucero 2002)。そこで、培養ラット背根神経節細胞の I_h の活性調節メカニズムへの PKA の関与の可能性をより直接的に検証するために、電極内液を介して PKAc を細胞内へ適用し、その I_h に対する効果を調べた。はじめに電極内液を介して細胞内に灌流した PKAc の活性の指標とするため I_{Ba} に対する PKAc の効果を確認した (図 17)。前述の ATP 及び PKI 存在下での実験 (図 15) と同様に、 I_{Ba} の振幅の時間経過を観察した所、PKAc (250 U/ml) 存在下では I_{Ba} の rundown は大幅に減弱し、340s 後の振幅は測定開始直後の $86.1 \pm 2.6\%$ に維持されていた ($n = 5$, 図 17A, B)。また、nifedipine 感受性の成分は $12.8 \pm 1.6\%$ だった ($n = 5$)。さらに電極内に適用した PKAc によるリン酸化を増強する目的で、フォスファターゼの阻害剤であるオカダ酸 (Okadaic acid, OA) を測定開始 40 s 後から細胞外液に添加した。コントロール電極内液 (100 μ M ATP) では、オカダ酸 1 μ M の適用により若干 rundown が抑制される傾向が見られた ($51.0 \pm 5.5\%$, $n = 5$, 図 17B)。PKAc (250 U/ml) を添加した電極内液使用時にオカダ酸を適用すると、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

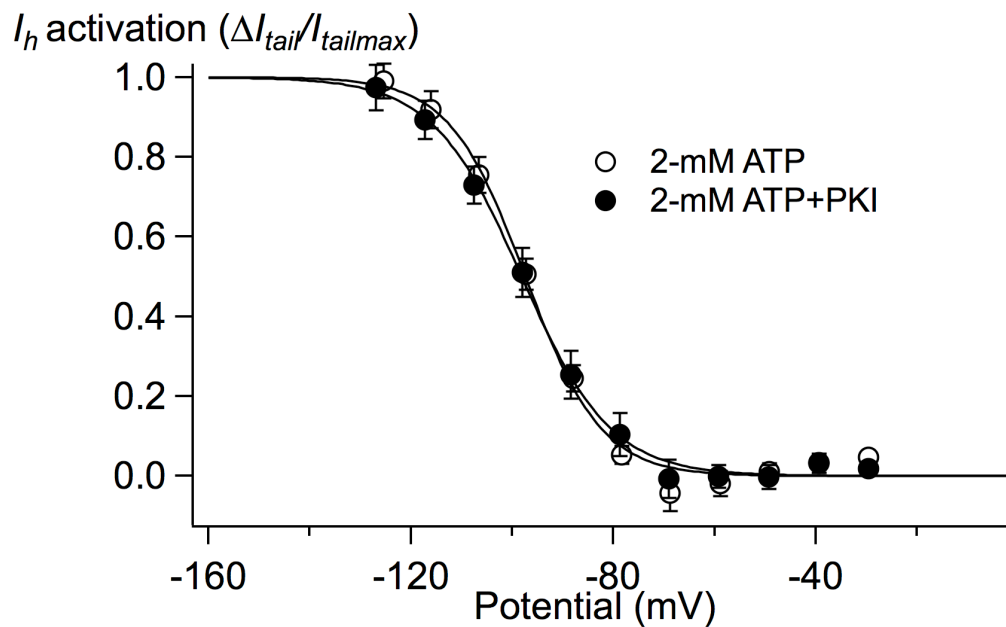
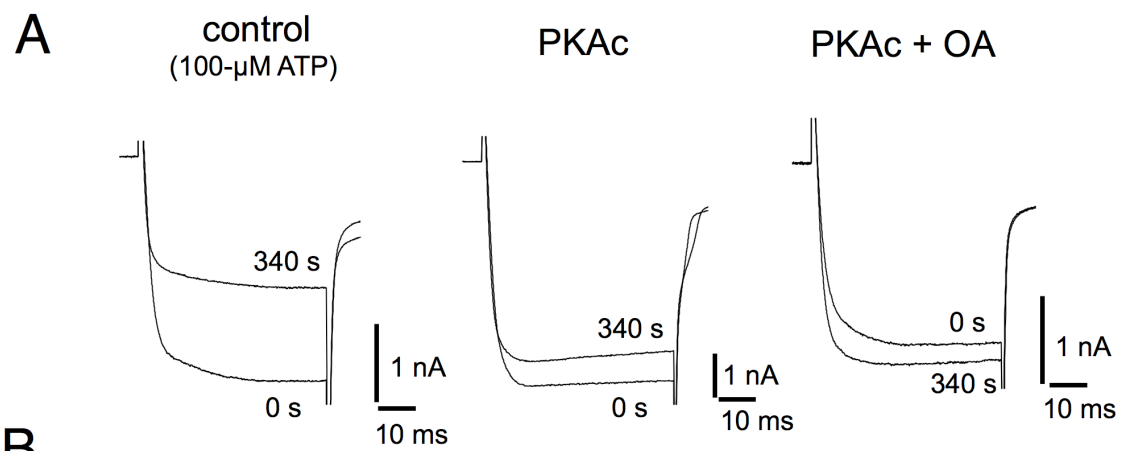


図16 細胞内ATPによる I_h の活性化作用に対するプロテインキナーゼ阻害ペプチド(PKI)の効果

ATP (2 mM)を含む電極内液にPKIを加えていない条件 (○, $n = 7$)とPKI 50 μ Mを加えた条件 (●, $n = 6$)での I_h の活性化曲線を示した。



B

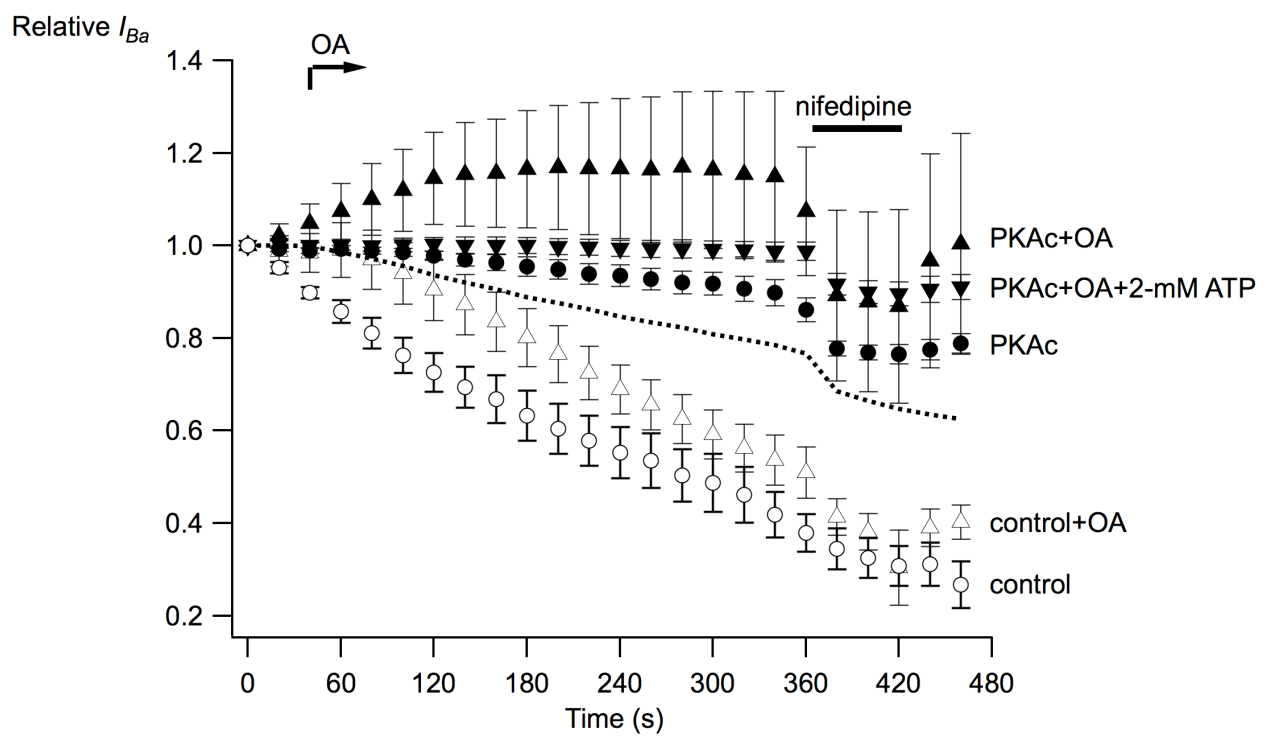


図17 ラット背根神経節細胞における電位依存性カルシウムチャネル電流の振幅の経時的変化に対するPKA触媒サブユニット (PKAc)及びフォスファターゼ阻害剤 (オカダ酸)の効果

A: 5 mM BaCl_2 存在下で保持電位-80 mVから-10 mVへの脱分極パルスによりバリウム電流を20 s間隔で誘発し、その振幅を経時的に観察した。コントロール電極内液及びPKAc (250 U/ml)を添加した電極内液を使用した際の測定開始時 (0 s)と340 s後の典型的な電流トレースを示した。オカダ酸 (OA)は測定開始後40 s後から細胞外液中に加えた。

B: 以下の条件で I_{Ba} を測定し経時的変化を測定開始直後の振幅に対する割合で示した。

○：コントロール電極内液 (100 μM ATP); $n = 11$

△：コントロール電極内液+オカダ酸 (OA, 1 μM); $n = 5$

●：PKAc(250 U/ml)含電極内液; $n = 5$

▲：PKAc(250 U/ml)含電極内液+オカダ酸 (OA, 1 μM); $n = 5$

▼：PKAc (250 U/ml)、ATP (2 mM)含電極内液+オカダ酸 (OA, 1 μM); $n = 5$

PKAc及びATPは電極内液に添加し、オカダ酸 (OA)は測定開始から40 s後から細胞外液中に加えた。すべての条件で図中に横線で表示した時間nifedipine (1 μM)を適用した。比較のため図13で示したATP (2 mM)存在下での I_{Ba} の経時的変化を点線で示した。

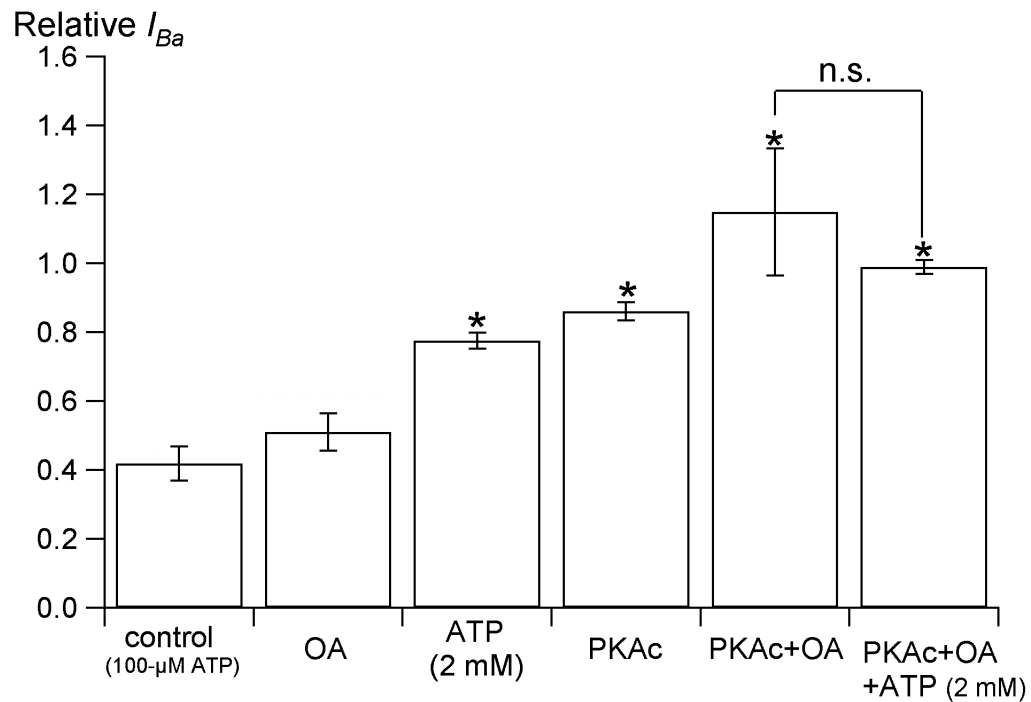
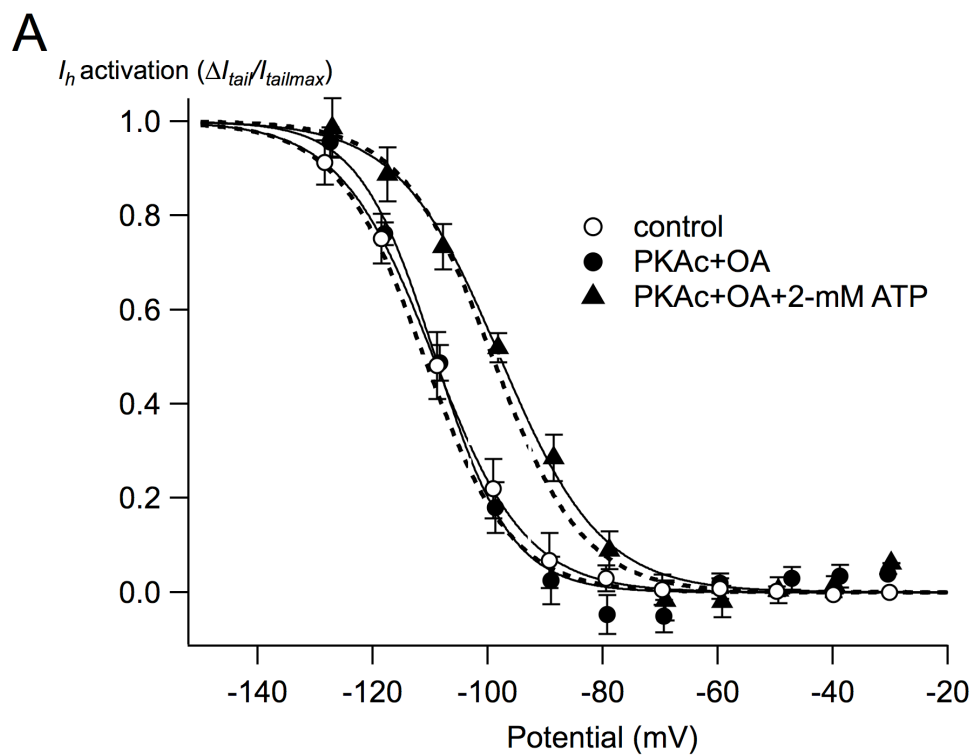


図18 測定開始から340 s後における電位依存性カルシウムチャネル電流の振幅

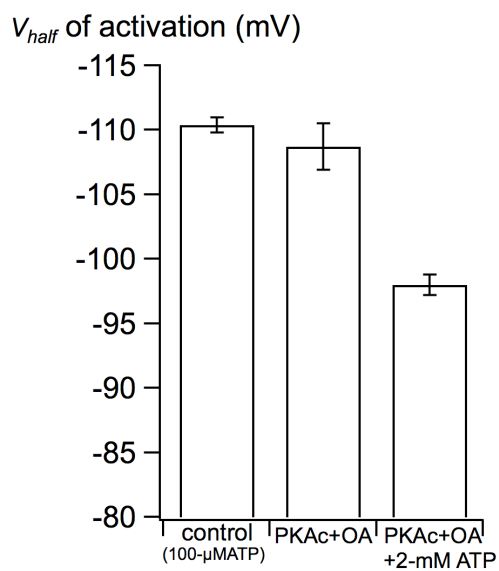
ATP (2 mM)又はPKAc (250 U/ml)を加えた電極内液及び細胞外にオカダ酸 (OA, 1 μ M)を適用した各条件で測定した I_{Ba} の測定開始から340 s後の振幅の測定開始直後の振幅に対する割合の平均値を示した。オカダ酸は測定開始後40 sから細胞外液に適用した。* $P < 0.01$ vs. control

した (図 17A, B)。測定開始から 340 s 後 (オカダ酸適用後 300 s)の振幅は $114.9 \pm 18.4\%$ ($n = 5$)だった。オカダ酸存在下での I_{Ba} の nifedipine 感受性の成分は $28.9 \pm 4.8\%$ ($n = 5$)となり、PKAc 単独の条件と比べて有意に増加した ($p < 0.01$)。これは nifedipine 感受性の L 型カルシウムチャネルのコンダクタンスが PKA によって増大したことを示唆している。 I_{Ba} の振幅はオカダ酸適用後 2~4 分で最大となりその後徐々に低下していく傾向が見られた。さらに PKAc 存在下で、電極内液中の ATP 濃度を 2 mM にした所、やはり rundown の抑制または振幅の増大が見られたが、ATP 濃度が 100 μ M (コントロール電極内液)の条件と比べて振幅の変化量に有意な違いはなかった ($98.8 \pm 2.0\%$, $n = 5$, $t = 340$ s, 図 17B, 図 18)。

これまでの結果からホールセルボルテージクランプ条件下で電極内液から適用した PKAc は、電位依存性カルシウムチャネルを指標とする限り、PKAc (250 U/ml)+オカダ酸 (1 μ M)+ATP (100 μ M)の条件で、十分に活性化されていることが確認された。そこで、この条件での I_h の活性化の電位依存性を調べ、外因性の PKAc による I_h の活性調節の有無を調べた (図 19)。PKAc の細胞内への電極を介しての流入や図 17B で示した活性化の時間経過を考慮し、 I_h の測定はホールセル記録が可能になってから少なくとも 2 分以上の時間を置いて開始した (I_h を活性化させるための 2 段階過分極パルスは 30 s 間隔で与えた)。さらに I_h 測定後に、同じ細胞から I_{Ba} を測定し、その振幅の変化の時間経過を観察することにより I_h を実際に測定した細胞での PKAc の活性の指標とした。コントロール電極内液を使用した場合の I_h の V_{half} は -110.4 ± 0.6 mV、 k は 7.4 ± 0.4 mV ($n = 16$)であった (図 19A, B, 表)。 I_h 測定後の I_{Ba} の振幅の変化を観察した所、 I_{Ba} の振幅は徐々に減少し、300 s 後に I_{Ba} 測定開始直後に対して $39.9 \pm 3.3\%$ ($n = 16$)まで減少した (図 19C)。PKAc (250 U/ml)を含む電極内液 (含 100 μ M ATP)とオカダ酸を組み合わせたときの I_h の V_{half} 及び k は -108.7 ± 1.8 mV、 7.1 ± 0.9 mV ($n = 9$)であり、コントロール電極内液で得られた値と有意な差はなかった (図 19B, 表)。また、それぞれの条件での最大活性化時 (-130 mV)の I_h の電流密度はコントロール電極内液では -1.5 ± 0.2 pA/pF ($n = 16$)、PKAc 及びオカダ酸存在下では -1.4 ± 0.2



B



C

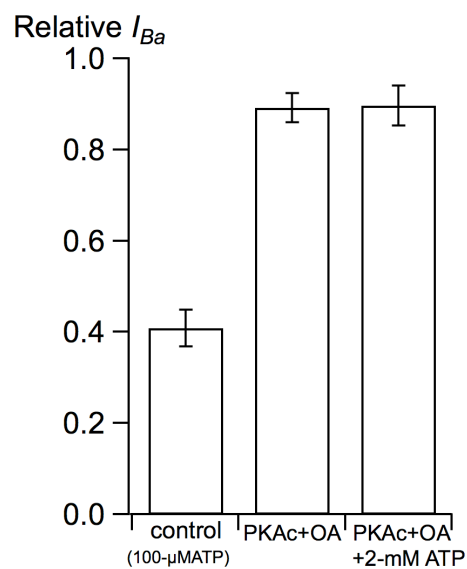


図19 ラット背根神経節細胞における I_h の活性化の電位依存性に対するPKAcの効果

PKAc及びオカダ酸存在下で I_h を測定し、 I_h の電位依存性を調べた。 I_h はパッチ膜を破りホールセルボルテージクランプを確立後少なくとも2分以上経過後に測定を開始した。

また I_h を測定後、同じ背根神経節細胞から I_{Ba} を測定し、その振幅の経時的変化を調べた。

A: コントロール電極内液使用時 (○, $n = 16$)、PKAc(250 U/ml)+オカダ酸 (OA, 1 μ M) 存在下 (●, $n = 8$)、PKAc(250 U/ml)+オカダ酸 (OA, 1 μ M) +ATP (2 mM)存在下 (▲, $n = 7$)での I_h の活性化曲線。

PKAcとATPはコントロール電極内液中に添加し、オカダ酸は細胞外液中に適用した。比較のため図11Cに示した、ATP (2 mM)存在下及び非存在下での I_h の活性化曲線を点線で示した。

B: Aで示した各条件下での I_h の活性化曲線の V_{half} の平均値を示した。

C: I_h を測定した細胞における I_h 測定後の I_{Ba} の振幅の変化。

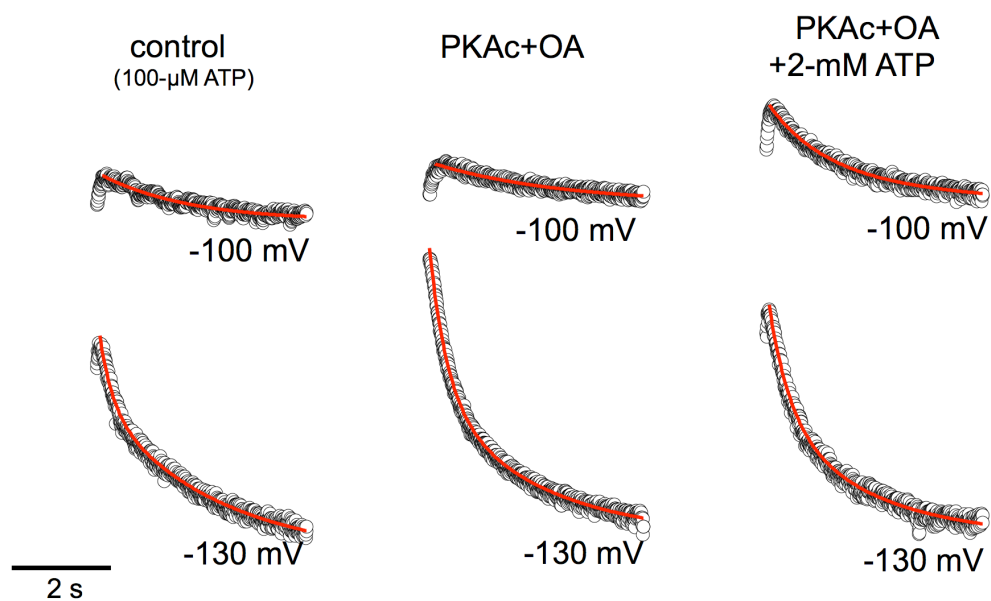
Aで示した各条件で I_h を測定した直後、細胞外液を I_{Ba} 測定用細胞外液に交換し、 I_{Ba} を測定した。 I_{Ba} は20 s間隔で誘起し経時的に300 s間測定した。各条件下で測定した I_{Ba} の測定開始から300 s後の振幅の変化率を測定開始直後の振幅に対する割合の平均値で示した。

pA/pF ($n = 8$)となりこの値も差は見られなかった (表)。しかし、 I_{Ba} の振幅は I_h 測定後も安定しており、300 s 後も振幅は I_{Ba} 測定開始直後の $89.2 \pm 3.2\%$ ($n = 8$)に維持されていた (図 19C)。さらに電極内の ATP 濃度を 2 mM に上げ、PKAc 及びオカダ酸適用時の I_h の活性化の電位依存性を調べた。図 19A に示したように I_h の活性化曲線はより浅い電位で活性化する方向にシフトした。 V_{half} は -98.0 ± 0.8 mV ($n = 7$) となりコントロール電極内液及び PKAc 電極 (含 100 μ M ATP)+オカダ酸の組み合わせから得られた値と有意な差が見られた ($p < 0.01$, 図 19B)。 I_h の電流密度には変化は見られず (-1.4 ± 0.2 pA/pF, $n = 7$)、また I_h 測定後に測定した I_{Ba} の振幅は 300 s 後も測定開始直後の $89.6 \pm 4.4\%$ ($n = 7$)に維持されていた (図 19C)。

12 I_h の活性化の時間経過に対する PKA 触媒サブユニットの効果

ラット嗅覚受容体では過分極パルスを与えた時の I_h の活性化スピードが PKA によって早くなることが報告されている。この作用は最大活性化電位でも見られることから、活性化の電位依存性のシフトとは異なる効果によると考えられる (Vargas and Lucero 2002)。そこで、ラット背根神経節細胞での PKAc 適用による I_h の活性化の時間経過に対する効果を調べた。各電位 ($-90 \sim -130$ mV)での I_h の電流トレースを二次指数関数で回帰し、時定数 τ (τ_{fast} 、 τ_{slow})を求めた (図 20A)。コントロール電極内液使用時では -130 mV への過分極パルスを与えたときに発生する I_h の活性化の時定数 τ_{fast} 及び τ_{slow} の値はそれぞれ、 0.30 ± 0.03 s、 2.3 ± 0.4 s ($n = 11$)だった。PKAc (250 U/ml)を添加した電極内液及びオカダ酸存在下での I_h の活性化の時定数は τ_{fast} 及び τ_{slow} ともに $-90 \sim -130$ mV の範囲のすべての膜電位でコントロール電極内液使用時との差は見られなかった (-130 mV: $\tau_{fast} = 0.36 \pm 0.05$ s, $\tau_{slow} = 2.4 \pm 0.3$ s, $n = 7$, 図 20B)。さらに PKAc+2 mM ATP+オカダ酸存在下では、 τ_{fast} の値がコントロール電極内液使用時と比較して小さい (活性化が早い)傾向が見られ、 -100 mV では有意な差が見られた ($p < 0.05$, 図 20B 左)。しかし、最大活性化時 (-130 mV)における時定数には有意な変化はなかった (-130 mV: $\tau_{fast} = 0.36 \pm 0.06$ s, $\tau_{slow} = 1.9 \pm 0.4$ s, $n =$

A



B

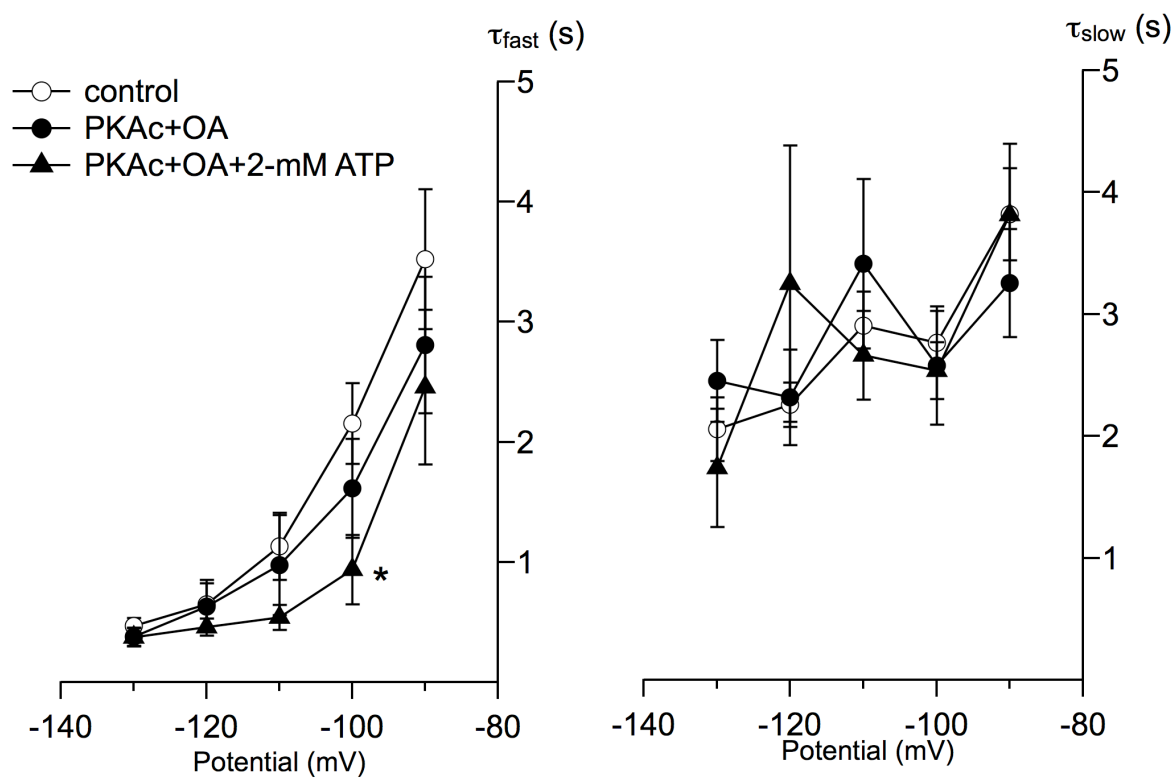


図20 ラット背根神経節細胞における I_h の活性化の時間経過に対するPKAcの効果

各条件で測定した I_h の電流トレースを二次指数関数で近似することによって活性化の時定数 (τ_{fast} , τ_{slow})を求め、 I_h の活性化の時間経過に対する影響を調べた。

A: コントロール電極内液使用時、PKAc(250 U/ml)+オカダ酸 (OA, 1 μ M)存在下、PKAc(250 U/ml) +オカダ酸 (OA, 1 μ M) +ATP (2 mM)存在下で保持電位-30 mVから-100 mV及び-130 mVへの過分極パルスを与えた後ときに発生する I_h の電流トレースの典型例。

PKAcとATPはコントロール電極内液中に添加し、オカダ酸は細胞外液中に適用した。

○は実際の電流トレースを、赤線は二次指数関数で近似した際の近似曲線を示す。

B: コントロール電極内液(○, $n = 16$)、PKAc(250 U/ml)+オカダ酸 (OA, 1 μ M)存在下 (●, $n = 8$)、PKAc (250 U/ml) +オカダ酸 (OA, 1 μ M) +ATP (2 mM)存在下 (▲, $n = 7$)での I_h の活性化の時間経過の時定数 (左側: τ_{fast} , 右側: τ_{slow})を I_h を誘起した際の膜電位に対してプロットした。 *: $p < 0.05$

7)。過分極パルス(-130 mV)をより長い持続時間 (8 s)で与えた条件でも時定数の比較を行ったが、いずれの条件もコントロール ($\tau_{\text{fast}} = 0.37 \pm 0.03$ s, $\tau_{\text{slow}} = 2.9 \pm 0.31$ s, n = 16) と比較して有意な差はなかった (表)。この結果はラットの背根神経節細胞の I_h の活性化の時間経過は PKA によって影響を受けないことを示唆している。

表 各条件下における I_h の電流密度 (-130 mV)、 V_{half} 、活性化の時定数のまとめ

	Current density at -130 mV (pA/pF)	V_{half} (mV)	τ_{fast} (S) at -130 mV	τ_{slow} (S) at -130 mV	n
control	-1.5 ± 0.2	-110.4 ± 0.6	0.37 ± 0.03	2.9 ± 0.31	16
PKAc + OA	-1.4 ± 0.2	-108.7 ± 1.8	0.36 ± 0.07	2.9 ± 0.50	8
PKAc + OA + 2-mM ATP	-1.4 ± 0.2	$-98.0 \pm 0.8^*$	0.40 ± 0.07	2.3 ± 0.47	7

活性化の時定数は持続時間8 sの過分極パルス(-130 mV)を与えたときの電流トレースを二次指数関数で近似したときに得られた値を示した。*:p < 0.05

IV 考察

1 培養ラット背根神経節における HCN サブタイプと I_h の電気生理学的性質

抗 HCN チャンネルサブユニット抗体を用いた免疫細胞化学染色の結果から、本研究で用いた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。またそれぞれのサブユニットの陽性細胞と陰性細胞の直径に偏りはなく、電気生理学的実験を行った細胞に発現している HCN サブタイプを細胞直径を基に予測することは困難であることがわかった。抗 HCN1 抗体陽性細胞の割合は他のサブタイプと比べて少なく、標本中にごくまれにしか観察されなかった。ラットの背根神経節のスライス標本を用いた報告では HCN1 陽性細胞は大直径(>40 μm)を持つ細胞により多く観察されることが報告されている (Tu *et al.* 2004)。今回用いた初代培養標本では直径 40 μm を超える細胞はごく少数しか見られず、大直径の細胞が分離、培養操作によって失われた可能性がある。そのため今回我々が用いた標本中に HCN1 陽性の細胞がまれにしか観察されなかったのかもしれない。さらに、Tu (2004)らは、ラットの背根神経節中には HCN2 陽性の細胞は細胞サイズにかかわらず広範に観察されるが、HCN4 の発現が非常にまれであることを報告している。本研究では HCN2 陽性細胞に加えて、HCN4 陽性細胞も多数観察された。ラットの背根神経節における HCN4 の発現について Vasilyev (2007)らはラットの背根神経節の凍結切片を用いた免疫組織化学染色において HCN2 よりは弱い HCN4 陽性の細胞の存在を報告している。一方で Kouranova (2008)らは定量 PCR の結果から HCN4 の mRNA 発現が非常に低く、免疫蛍光染色によっても HCN4 発現が殆ど見られないことを報告した。さらに Cho (2009)らはラットの背根神経節中の HCN4 陽性細胞はすべての細胞サイズに偏りなく分布するが、割合は全体の 4.7%に限られることを報告している。HCN4 の発現に関するこれらの報告と本研究結果との解離について、その原因は不明である。今回用いた免疫組織化学的手法からは発現している HCN サブユニットの定量的な議論はできない。酵素処理による分離と初代培養を

経て HCN サブユニットの発現量や分布が変化した可能性も考えられ、mRNA 量やタンパク量の定量や、培養日数の影響等、今後さらに検討する必要がある。

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。HCN各サブタイプから構成されるイオンチャネルは活性化の時間経過に差があることが知られている。HCN1が最も早く活性化し ($\tau_{fast} < 100$ ms, $\tau_{slow} < 500$ ms)、HCN2、HCN4はより遅い時間経過で活性化する (Kaupp and Seifert 2001)。この情報を基に各組織で見られる I_h について、活性化の時定数の値からチャネルを構成するHCNサブタイプを推定する試みも広く行われている (Franz *et al.* 2000; Koch and Grothe 2003; Ulens and Tytgat 2001)。ラットの背根神経節細胞において二次指数関数による回帰から求めた最大活性化電位(-130 mV)での活性化の時間経過の時定数は τ_{fast} 、 τ_{slow} の値がそれぞれ0.37 s、2.1 sだった。この値は、HCN1よりもHCN2またはHCN4により近く、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チャネルの構成に関与している可能性を示唆している (Kaupp and Seifert 2001)。HCNサブユニットは4量体を構成し I_h を担うイオンチャネルとして機能する。さらに異なるサブユニット同士がヘテロ4量体を構成し機能的なチャネルとして発現できることが確認されておりHCN2とHCN4もヘテロなチャネルを構成することが確認されている (Whitaker *et al.* 2007; Ye and Nerbonne 2009)。培養ラット背根神経節細胞において、HCN2及びHCN4単独のサブユニットからなるチャネルが発現しているのか、またはHCN2とHCN4のヘテロな構成のチャネルが発現しているのか、またはそのいずれもが共存しているのかについては本研究結果からは不明である。

2 細胞内 cAMP 及び ATP の I_h に対する効果

マウスでのRaes (1997)らの報告と同様、ラット背根神経節細胞の I_h も細胞内のATPによって活性化の電位依存性が調節されることが確認された。一方、その作用機序については異なる結果が得られた。マウスではcAMPとATPが同時に存在する場合、cAMPの直接作用と

PKAによるリン酸化という異なる作用機序により I_h は調節を受け、cAMPとATPの共存によってそれぞれ単独に存在する場合と比べてさらに I_h を活性化することが示された。しかし、ラット背根神経節ではcAMPとATPの共存ではそれぞれ単独の場合と比べて V_{half} の値に有意な差は見られなかった。この結果はラットの背根神経節ではATPによる I_h の調節がマウスの背根神経節とは異なる作用機序によって引き起こされた可能性を示唆している。細胞内ATPの作用機序として、ATPの添加によってアデニル酸シクラーゼを介して産生されるcAMP量が増加し、直接cAMPを添加した場合と同じ機序で I_h を活性化させる可能性が予想されたが、アデニル酸シクラーゼ阻害剤であるSQ 22,536を用いた実験結果からこの可能性は否定された。

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。ATP- γ -Sはプロテインキナーゼの基質として不可逆的なチオリン酸化を引き起こすため、内因性のプロテインキナーゼによるリン酸化活性に影響を与えた可能性がある (Eckstein 1985; Liou *et al.* 1999)。しかしながら一方で、プロテインキナーゼの基質として働かず、リン酸化反応に関与しないAMP-PNPによっても I_h の電位依存性のシフトが見られた。これらの結果は細胞内に添加したATPが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。近年、外因性及び、内因性のPI(4,5)P₂がHCN2及び I_f を活性化すること、リン脂質関連キナーゼによるリン酸化を介してMgATPがHCN2電流の活性化曲線をシフトさせることが報告された (Pian *et al.* 2006)。本研究での結果に関して、ラットの背根神経節細胞におけるATPの I_h に対する効果が脂質リン酸化を介したPI(4,5)P₂レベルの変化によるものである可能性を完全には否定できない。しかしながら、AMP-PNPによってもATPの I_h に対する効果が再現できたことから、ラットの背根神経節における I_h に対するATPの効果は脂質のリン酸化とPI(4,5)P₂産生だけでは説明できない機序を介して行われていると考えられる。非加水分解性のATP類似物質の結果から予想されるATPの作用機序として、細胞内の遊離ATP (free ATP)自身がチャネル関連タンパクと相互作用することにより I_h を調節している可能性が考えられる。本実験で用いた電極内液中の遊離ATP (free ATP)濃度をソフトウェア (Maxchelator software, Stanford

University)を用いて計算した所、1 mM ATP、2 mM ATPを添加した溶液中の遊離 ATP濃度はそれぞれ91.3 μ M、417 μ Mと約4倍の差があった。この遊離ATP濃度の差が1 mM ATPピペットと2 mM ATPピペットの I_h に対する作用の違いとして現れたのかも知れない。しかしながら、詳細な I_h の遊離ATP濃度依存性は検討しておらず、また実際に遊離ATPがHCNサブユニットと相互作用し得るのかは本研究の結果からは不明であり、この点は今後さらなる検討が必要である。背根神経節細胞の細胞内ATP濃度に関して、成モルモットやトリ胚ではそれぞれ、1.7 mM、1.5~2 mMであるとの報告がある (Fukuda *et al.* 1983; Schousboe *et al.* 1970)。ラットの背根神経節細胞のATP濃度も同程度の範囲にあると仮定すると、ラットの背根神経節細胞では細胞内のATPによって I_h の電位依存性がある程度活性化された状態に維持されている可能性がある。ラット背根神経節細胞ではATP単独の条件とcAMPとATPが同時に存在する条件では I_h の活性化の電位依存性に有意な差はなかったことから、何らかの伝達物質を介したcAMP濃度上昇による調節も実際にはより狭い範囲の変動に限定されるかもしれない。

3 I_h の活性調節機構に対する PKA の関与の可能性

ラットの背根神経節細胞において I_h の活性化機構におけるPKAの関与について検討した報告は無い。 I_h 及びHCN電流のおもな活性化調節メカニズムはcAMPによる直接作用がよく知られているが、動物組織から測定された I_h ではPKAによるリン酸化がcAMPによる I_h の活性化に関与していることを示唆する報告が複数ある (Chang *et al.* 1991; Liao *et al.* 2010; Tokimasa and Akasu 1990; Vargas and Lucero 2002)。現在までにPKAは I_h に対して、1)活性化の電位依存性をシフトさせる、2)コンダクタンスを増大させる、3)活性化の時間経過に影響を与える効果が報告されている。本研究の実験結果からラット背根神経節初代培養細胞の I_h の調節機構にはこれらのPKAの作用の関与はないことが明らかとなった。

興奮性細胞に見られるL型の電位依存性カルシウムチャネル電流はPKAによるリン酸化によって調節を受け、活性化することがよく知られている (McDonald *et al.* 1994)。また、ホールセルボルテージクランプ下において測定されるL型カルシウム電流は測定開始直後から電

流の振幅が急速に減少するrundownと呼ばれる現象が見られる。この現象のメカニズムの一部には調節因子の流出による脱リン酸化の関与が考えられている。さらに、ラットでは知覚神経である迷走神経下神経節において、PKAの触媒サブユニットがL型だけでなくN型カルシウムチャンネルについてもrundownの抑制及び電流の振幅の上昇を引き起こすことが報告されている (Gross *et al.* 1990)。ラットの背根神経節においても電位依存性のカルシウムチャンネル電流 (バリウム電流, I_{Ba}) の振幅は測定開始後、徐々に減少した。この I_{Ba} のrundownは電極内液にATPまたはPKAの触媒サブユニットを添加することによって大幅に抑制された。また、50 μ MのPKIは2 mMのATPによる I_{Ba} のrundownの抑制に若干であるが有意な作用を示した。これはATPによる I_{Ba} のrundownの抑制効果の少なくとも一部に、PKAによるカルシウムチャンネルのリン酸化が関与していることを示唆している。一方、高濃度のPKI (50 μ M)でも、ATP (2 mM)存在下の 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。 I_{Ba} のrundownを十分に抑制する条件 (PKAc 250 U/ml、ATP 100 μ M、OA 1 μ M存在下)での I_h の活性化の電位依存性にはコントロールとの有意な差は認められなかった。一方、 I_h 測定後の同一細胞からの I_{Ba} の測定では I_{Ba} のrundownの抑制効果は維持されており、 I_h を測定した条件でもPKAc活性は十分上昇していたことが確認された。この結果は、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。今回、PKAc及びオカダ酸存在下において、ATP濃度の差によって I_{Ba} を指標としたPKAc活性には差が見られなかった。PKAのATPに対する K_m 値は3~15 μ Mであることが報告されており、コントロールとして使用した100 μ M ATPを含む電極内液を使用することによって、細胞内には十分な量のATPが存在していたと考えられる (Flockhart and Corbin 1982)。一方で、 I_h の電位依存性はATP濃度を2 mMに上げることによって正にシフトした。これらの結果はATPの I_h に対する作用はPKAの関与しないメカニズムによって引き起こされるというこれまでの本研究の一連の結果と一致する。

ラット背根神経節細胞において、PKA活性の増強は-130 mVにおける I_h の電流密度に有意な影響を与えなかった。さらに、ホールセル記録開始後、パッチ電極を介したPKAcを含む電極内液の灌流によって I_h の振幅が変化することも無かった。これは細胞内のPKAの活性が I_h チャンネルのコンダクタンスに影響を与えないことを示唆している。さらに、本研究では、 I_h の活性化の時間経過の指標である時定数(τ)に対するPKAの影響を示す結果は得られなかった。またTu (2004)らはラットの背根神経節細胞の I_h の電気生理学的性質は直径の大きな細胞群ほど電流密度が大きく、活性化の時間経過が早いことを報告している。しかしながら、本研究で得られたデータからは電流密度の高低と I_h の活性化の時間経過との関連は認められなかった。

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、コンダクタンスおよ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。本研究では実際に電流を測定している個々の細胞のPKAの作用を知るために、 I_h と既に多くのPKAによる調節が報告されている I_{Ba} との同時測定を行った。しかしながら、本研究では今回設定した条件で実際に I_h を構成するHCNチャンネル、又はその調節に関わる何らかの関連タンパクのリン酸化の有無を示す直接的な証拠はない。そのためPKAcの I_h に対する効果が無いという今回の一連の結果の原因がHCNチャンネルをリン酸化するのに十分な条件ではなかった可能性を完全に否定することはできない。現在までにHCNサブユニットのPKAによるリン酸化が確かめられたのはHCN4サブユニットのみである (Liao *et al.* 2010)。LiaoらはPKAのリン酸化共通配列を含むHCN4サブユニット断片のいくつかがPKAによってリン酸化されることを確認した。さらにLiaoらはCHO細胞に発現させたHCN4がホールセルボルテジクランプ条件下でピペットを介して適用したPKAc (20 U/ml)によって I_h の活性化の電位依存性のシフトを引き起こすことを報告している。種々の条件が異なるため単純に本研究の実験条件と比較することはできないが、今回の実験条件では I_{Ba} に対する効果を見る限り、少なくともHCN4のリン酸化に十分なPKAc (250 U/ml)がチャンネルの存在する細胞膜近傍まで到達し

ていると考えられる。今回、培養ラット背根神経節細胞ではHCN2及びHCN4の発現の可能性が示唆されたが、HCN2とHCN4が実際に I_h を担うチャネルの構成にどの程度関与しているかは不明である。HCN4以外のHCNサブユニット(HCN1-3)、特にHCN2のリン酸化の可能性及びそれに必要なPKA活性の条件等は今後の重要な検討課題である。また、異なる組織、動物種から測定された I_h の性質の違いは必ずしもチャネルを構成するサブユニットの違いだけでは説明できない例も多く、現在、これらの相違を説明するため新たな修飾サブユニットの存在が提唱されている(Altomare *et al.* 2003; Santoro *et al.* 2004; Yu *et al.* 2001)。ラットの嗅覚受容体では見られるPKAによるリン酸化を介した I_h の調節がラットの背根神経節では見られなかったのは、このような未知の要素の欠落によるのかもしれない。

V 総括

ラット背根神経節細胞における過分極活性化陽イオン電流(I_h)の活性調節機構におけるPKAと細胞内ATPの役割を調べるために、初代培養細胞を用いて免疫細胞化学染色並びにホールセルボルテージクランプ法による電流測定を行い、以下の成績を得た。

1. 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の結果から本研究で用いたラットの背根神経節細胞初代培養標本においてHCN2又はHCN4サブユニットが発現している可能性が示唆された。
2. ホールセルボルテージクランプ下において保持電位を-60 mVから-130 mVまでの様々な電位への過分極パルスを与えたところ緩やかな時間経過で活性化する内向き電流 (I_h)が発生した。細胞外に2 mMのCsCl及びBaCl₂を適用した際の-130 mVにおける I_h の抑制率はそれぞれ79.2 ± 6.4%、34.5 ± 7.1%だった。
3. I_h の反転電位は標準細胞外液およびK-rich電極内液条件下で、-20.3 ± 5.0 mVだった。
4. 細胞内に1 mM cAMPを添加すると I_h の活性化曲線の V_{half} の値が約15 mV正の方向へシフトした。同様に適用した1mMのATPでは効果は見られなかったが、ATP濃度を2 mMにあげると、 V_{half} に近い-90 mV前後で活性化する I_h の振幅の増大と活性化曲線のシフトが観察された。
5. cAMP (1 mM)とATP (2 mM)の同時適用はcAMP単独、2 mM ATP単独の条件と比較して V_{half} の値に有意な差はなく活性化曲線の共存による更なるシフトは見られなかった。
6. ATP (2 mM)存在下での I_h の V_{half} の値はアデニル酸シクラーゼ阻害薬 (SQ 22,536) の適用によって有意な変化は見られなかった。
7. 細胞内ATPによる I_h の電位依存性に対する効果は非加水分解性のATP類似物質であるATP- γ -S及びAMP-PNPによって再現された。

8. PKA阻害剤であるH-89による前処置は細胞内ATPによる I_h の電位依存性に対する効果に影響を与えなかった。
9. Cs-rich電極内液では I_h の V_{half} は -112.5 ± 1.5 mVであり、 V_{half} の値はK-rich電極内液を用いた場合と比べて約10 mV過分極方向にシフトしていた。しかし、ATP (2 mM)を電極内液に添加すると、K-rich電極内液を使ったときと同様、 V_{half} の値は約10 mV脱分極方向にシフトした。
10. コントロール電極内液 (Cs-rich電極内液)を用いた場合、 I_{Ba} の振幅は時間経過とともに徐々に減少していく傾向が見られた (rundown) 。2 mMのATPを電極内に入れて I_{Ba} を測定するとrundownは大幅に減少した。
11. ATP (2 mM)を含む細胞内液にPKI (50 μ M)を添加するとATPによるrundownの抑制効果が有意に減少した。ATP (2 mM)存在下でPKIを入れた条件での I_h の活性化の V_{half} はATP単独 (PKI非存在下)での値と比べて有意な変化は見られなかった。
12. PKAc存在下では I_{Ba} のrundownは大幅に減弱し、測定開始後340sでの振幅は測定開始直後の $86.1 \pm 2.6\%$ に維持されていた。PKAcを添加した電極内液使用時にオカダ酸を細胞外に適用すると、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。
13. PKAc を含む電極内液 とオカダ酸を組み合わせたときの V_{half} は -108.7 ± 1.8 mVでありコントロール電極内液で得られた値と有意な差はなかった 。PKAc及びオカダ酸存在下で電極内のATP濃度を2 mMに上げると I_h の活性化曲線はより浅い電位にシフトした。 I_h 測定後に測定した I_{Ba} の振幅は300 s後も測定開始直後の $89.6 \pm 4.4\%$ に維持されていた。
14. PKAc (250 U/ml)を添加した電極内液及びオカダ酸存在下での I_h の活性化の時定数は τ_{fast} 及び τ_{slow} ともに $-90 \sim -130$ mVの範囲のすべての膜電位でコントロール電極内液使用時との差は見られなかった。

以上の成績から、ラット背根神経節細胞における I_h の活性調節機構にはPKAの関与はなく、 I_h の電位依存性は細胞内のATPによってアデニル酸シクラーゼ及びPKAの関与のない経路によって活性化されることが明らかとなった。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始懇切丁寧な御指導と御校閲を頂きました葉原芳昭教授 (北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室) に厚く感謝いたしますとともに、副査として本論文を御校閲、御指導をいただきました稲葉睦教授 (同診断治療学講座臨床分子生物学教室)、乙黒兼一准教授 (同比較形態機能学講座薬理学教室)、坂本健太郎講師 (同比較形態機能学講座生理学教室) に深く感謝いたします。また研究を遂行するにあたり的確な御指導、御助言を頂きました石川透教授 (帯広畜産大学基礎獣医学研究部門形態機能学分野)、北村直樹准教授 (鳥取大学農学部獣医生理学教室)、ならびに多大なる御協力をいただきました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座生理学教室の教室員の皆様に深く感謝いたします。

また、本研究を遂行するに当たり尊い生命を捧げてくれた動物たちの冥福を心よりお祈りいたすとともに、感謝の意に代えたいと思います。

英文抄録

STUDIES ON THE MODULATORY MECHANISMS OF HYPERPOLARIZATION-ACTIVATED CATION CURRENT (I_h) IN RAT DORSAL ROOT GANGLION CELLS: CYTOSOLIC ATP- INDUCED ACTIVATION OF I_h WITHOUT INVOLVEMENT OF PHOSPHORYLATION BY PKA

You Komagiri

Department of Physiology, School of Medicine, Iwate Medical University, 2-1-1 Nishitokuta,
Yahaba, 028-3694, Japan.

To confirm the contribution of PKA-induced phosphorylation to the regulatory mechanisms of hyperpolarization-activated cation current (I_h) and the effect of intracellular ATP on the electrophysiological properties of I_h , whole-cell current recording and immunocytochemical staining was performed in cultured rat dorsal root ganglion (DRG) cells. These results obtained were as follows:

1. Immunocytochemical experiments using specific antibodies against HCN channel subunits (HCN1-4) indicated that cultured rat DRG cells might express HCN2 or HCN4 channels.
2. Under conventional whole-cell voltage-clamp conditions, hyperpolarizing voltage steps from a holding potential of -60 mV to potentials between -70 and -130 mV elicited slowly activating inward currents (I_h). Extracellular applications of 2 mM Cs^+ and 2 mM Ba^{2+} reduced the amplitude of I_h by $79.2 \pm 6.4\%$ and $34.5 \pm 7.1\%$, respectively.
3. The reversal potential of I_h was -20.3 ± 5.0 mV.
4. The activation curve of I_h in rat DRG cells shifted by about 15 mV in the positive direction with an intracellular solution containing 1-mM cAMP. When 2-mM ATP was applied intracellularly, the half-maximal activation voltage (V_{half}) of I_h shifted from -97.4 ± 1.9 mV to -

86.8 ± 1.6 mV, resulting in an increase in the current amplitude of I_h by the pulse to between -80 and -90 mV.

5. The V_{half} of I_h using the pipette solution containing both ATP (2 mM) and cAMP (1 mM) together was not significantly different from that obtained in the presence of ATP or cAMP alone.
6. In the presence of 2-mM ATP, the V_{half} of I_h was not influenced by the application of an adenylate cyclase inhibitor SQ 22,536.
7. Intracellular dialysis of non-hydrolysable ATP analogs, AMP-PNP and ATP- γ -S mimicked the effect of ATP on the voltage-dependence of I_h .
8. Preincubation and external application of H-89, a PKA inhibitor failed to influence the effect of intracellular ATP on the voltage-dependence of I_h .
9. In neurons dialyzed with the Cs-rich pipette solution, the V_{half} of I_h was more negative by about 10 mV than that obtained with the K-rich pipette solution. However, similar to the result obtained with K-rich pipette solution, when ATP (2 mM) was added to the Cs-rich pipette solution, the voltage-dependency of I_h was shifted about 10 mV in the positive direction.
10. The amplitudes of I_{Ba} rapidly decreased with time (rundown) using the control pipette solution. With the pipette solution containing 2-mM ATP, the rundown of I_{Ba} was largely diminished.
11. In the presence of PKI (50 μ M) the rundown of I_{Ba} amplitude was significantly larger than that observed with ATP (2 mM) alone. ATP-induced depolarizing shift of I_h activation was not affected by PKI.
12. When catalytic subunit of PKA (PKAc, 250 U/mL) was applied intracellularly, the rundown of I_{Ba} was markedly and significantly decreased and the current amplitude at 340 s was 86.1 ± 26 %. The bath application of okadaic acid (OA, 1 μ M) enhanced the effect of PKA on the

rundown of I_{Ba} . In some neurons dialyzed with PKAc, an increase in the amplitude of I_{Ba} was observed in the presence of OA.

13. In the neurons dialyzed with the PKAc containing pipette solution and exposed to OA, the V_{half} of I_h was -108.7 ± 1.8 mV, which was not significantly different from that without PKAc and OA. When the concentration of ATP was raised to 2 mM in the presence of PKAc, the activation curve of I_h significantly shifted in the depolarizing direction.

14. In neurons dialyzed with PKAc in the presence of OA, activation time constant, τ_{fast} and τ_{slow} were not influenced between -90 and -130 mV.

Based on these results, it is clarified that the PKA-induced phosphorylation do not play a major role in the modulating mechanism of I_h and intracellular ATP can regulate the voltage-dependency of I_h activation by adenylate cyclase- and PKA- independent mechanisms in cultured rat DRG cells.

引用文献

1. **Abi-Gerges N, Ji GJ, Lu ZJ, Fischmeister R, Hescheler J, and Fleischmann BK.** Functional expression and regulation of the hyperpolarization activated non-selective cation current in embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol* 523 Pt 2: 377-389, 2000.
2. **Altomare C, Terragni B, Brioschi C, Milanese R, Pagliuca C, Viscomi C, Moroni A, Baruscotti M, and DiFrancesco D.** Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 549: 347-359, 2003.
3. **Biel M, Ludwig A, Zong X, and Hofmann F.** Hyperpolarization-activated cation channels: a multi-gene family. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 136: 165-181, 1999.
4. **Biel M, Wahl-Schott C, Michalakakis S, and Zong X.** Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol Rev* 89: 847-885, 2009.
5. **Brown H, DiFrancesco D, and Noble S.** Cardiac pacemaker oscillation and its modulation by autonomic transmitters. *J Exp Biol* 81: 175-204, 1979.
6. **Cardenas CG, Mar LP, Vysokanov AV, Arnold PB, Cardenas LM, Surmeier DJ, and Scroggs RS.** Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol (Lond)* 507-523, 1999.
7. **Chang F, Cohen IS, DiFrancesco D, Rosen MR, and Tromba C.** Effects of protein kinase inhibitors on canine Purkinje fibre pacemaker depolarization and the pacemaker current i_f . *J Physiol* 440: 367-384, 1991.
8. **Chaplan SR, Guo HQ, Lee DH, Luo L, Liu C, Kuei C, Velumian AA, Butler MP, Brown SM, and Dubin AE.** Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J Neurosci* 23: 1169-1178, 2003.
9. **Cho HJ, Staikopoulos V, Ivanusic JJ, and Jennings EA.** Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated 4 (HCN4) protein is expressed in a subset of rat dorsal root and trigeminal ganglion neurons. *Cell Tissue Res* 338: 171-177, 2009.

10. **DiFrancesco D.** The role of the funny current in pacemaker activity. *Circ Res* 106: 434-446, 2010.
11. **Eckstein F.** Nucleoside phosphorothioates. *Annu Rev Biochem* 54: 367-402, 1985.
12. **Flockhart DA, and Corbin JD.** Regulatory mechanisms in the control of protein kinases. *CRC Crit Rev Biochem* 12: 133-186, 1982.
13. **Franz O, Liss B, Neu A, and Roeper J.** Single-cell mRNA expression of HCN1 correlates with a fast gating phenotype of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated ion channels I_h in central neurons. *Eur J Neurosci* 12: 2685-2693, 2000.
14. **Fukuda J, Fujita Y, and Ohsawa K.** ATP content in isolated mammalian nerve cells assayed by a modified luciferin-luciferase method. *J Neurosci Methods* 8: 295-302, 1983.
15. **Gross RA, Uhler MD, and Macdonald RL.** The cyclic AMP-dependent protein kinase catalytic subunit selectively enhances calcium currents in rat nodose neurones. *J Physiol* 429: 483-496, 1990.
16. **Harper AA, and Lawson SN.** Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol* 359: 31-46, 1985a.
17. **Harper AA, and Lawson SN.** Electrical properties of rat dorsal root ganglion neurones with different peripheral nerve conduction velocities. *J Physiol* 359: 47-63, 1985b.
18. **Ishii TM, Takano M, Xie LH, Noma A, and Ohmori H.** Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J Biol Chem* 274: 12835-12839, 1999.
19. **Kaupp UB, and Seifert R.** Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol* 63: 235-257, 2001.
20. **Koch U, and Grothe B.** Hyperpolarization-activated current (I_h) in the inferior colliculus: distribution and contribution to temporal processing. *J Neurophysiol* 90: 3679-3687, 2003.

21. **Kouranova EV, Strassle BW, Ring RH, Bowlby MR, and Vasilyev DV.** Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA and protein expression in large versus small diameter dorsal root ganglion neurons: correlation with hyperpolarization-activated current gating. *Neuroscience* 153: 1008-1019, 2008.
22. **Liao Z, Lockhead D, Larson ED, and Proenza C.** Phosphorylation and modulation of hyperpolarization-activated HCN4 channels by protein kinase A in the mouse sinoatrial node. *J Gen Physiol* 136: 247-258, 2010.
23. **Liou HH, Zhou SS, and Huang CL.** Regulation of ROMK1 channel by protein kinase A via a phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5820-5825, 1999.
24. **Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, and Biel M.** A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591, 1998.
25. **Masuda N, Hayashi Y, Matsuyoshi H, Chancellor MB, de Groat WC, and Yoshimura N.** Characterization of hyperpolarization-activated current (I_h) in dorsal root ganglion neurons innervating rat urinary bladder. *Brain Res* 1096: 40-52, 2006.
26. **Mayer ML, and Westbrook GL.** A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *J Physiol (Lond)* 340: 19-45, 1983.
27. **McDonald TF, Pelzer S, Trautwein W, and Pelzer DJ.** Regulation and modulation of calcium channels in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. *Physiol Rev* 74: 365-507, 1994.
28. **Mistrik P, Mader R, Michalakakis S, Weidinger M, Pfeifer A, and Biel M.** The murine HCN3 gene encodes a hyperpolarization-activated cation channel with slow kinetics and unique response to cyclic nucleotides. *J Biol Chem* 280: 27056-27061, 2005.
29. **Much B, Wahl-Schott C, Zong X, Schneider A, Baumann L, Moosmang S, Ludwig A, and Biel M.** Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of

- functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J Biol Chem* 278: 43781-43786, 2003.
30. **Pape HC**. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 58: 299-327, 1996.
31. **Pian P, Bucci A, Robinson RB, and Siegelbaum SA**. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J Gen Physiol* 128: 593-604, 2006.
32. **Raes A, Wang Z, van den Berg RJ, Goethals M, Van de Vijver G, and van Bogaert PP**. Effect of cAMP and ATP on the hyperpolarization-activated current in mouse dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Arch* 434: 543-550, 1997.
33. **Robinson RB, and Siegelbaum SA**. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 65: 453-480, 2003.
34. **Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, and Siegelbaum SA**. Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J Neurosci* 20: 5264-5275, 2000.
35. **Santoro B, and Tibbs GR**. The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 741-764, 1999.
36. **Santoro B, Wainger BJ, and Siegelbaum SA**. Regulation of HCN channel surface expression by a novel C-terminal protein-protein interaction. *J Neurosci* 24: 10750-10762, 2004.
37. **Schousboe A, Booher J, and Hertz L**. Content of ATP in cultivated neurons and astrocytes exposed to balanced and potassium-rich media. *J Neurochem* 17: 1501-1504, 1970.

38. **Scroggs RS, Todorovic SM, Anderson EG, and Fox AP.** Variation in I_H , I_{IR} , and I_{LEAK} between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Neurophysiol* 71: 271-279, 1994.
39. **Tokimasa T, and Akasu T.** Cyclic AMP regulates an inward rectifying sodium-potassium current in dissociated bull-frog sympathetic neurones. *J Physiol* 420: 409-429, 1990.
40. **Tu H, Deng L, Sun Q, Yao L, Han JS, and Wan Y.** Hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channels: roles in the differential electrophysiological properties of rat primary afferent neurons. *J Neurosci Res* 76: 713-722, 2004.
41. **Ulens C, and Tytgat J.** Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J Biol Chem* 276: 6069-6072, 2001.
42. **Vargas G, and Lucero MT.** Modulation by PKA of the hyperpolarization-activated current (I_h) in cultured rat olfactory receptor neurons. *J Membr Biol* 188: 115-125, 2002.
43. **Vasilyev DV, Shan Q, Lee Y, Mayer SC, Bowlby MR, Strassle BW, Kaftan EJ, Rogers KE, and Dunlop J.** Direct inhibition of I_h by analgesic loperamide in rat DRG neurons. *J Neurophysiol* 97: 3713-3721, 2007.
44. **Wang Z, Van Den Berg RJ, and Ypey DL.** Hyperpolarization-activated currents in the growth cone and soma of neonatal rat dorsal root ganglion neurons in culture. *J Neurophysiol* 78: 177-186, 1997.
45. **Whitaker GM, Angoli D, Nazzari H, Shigemoto R, and Accili EA.** HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J Biol Chem* 282: 22900-22909, 2007.
46. **Ye B, and Nerbonne JM.** Proteolytic processing of HCN2 and co-assembly with HCN4 in the generation of cardiac pacemaker channels. *J Biol Chem* 284: 25553-25559, 2009.
47. **Yu H, Chang F, and Cohen IS.** Pacemaker current i_f in adult canine cardiac ventricular myocytes. *J Physiol* 485 (Pt 2): 469-483, 1995.

48. Yu H, Wu J, Potapova I, Wymore RT, Holmes B, Zuckerman J, Pan Z, Wang H, Shi W, Robinson RB, El-Maghrabi MR, Benjamin W, Dixon J, McKinnon D, Cohen IS, and Wymore R. MinK-related peptide 1: A β subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation. *Circ Res* 88: E84-87, 2001.