

電気生理学的手法による受容体チャネルの研究

2001年3月

岩手大学大学院工学研究科

電子情報工学専攻

福島 央之

|  |    |
|--|----|
| 要約.....  | 1  |
| <b>第 1 章 序論</b>  |    |
| 1. 1. アミノ酸受容体チャネルの分類.....  | 3  |
| 1. 2. 分子構造.....  | 5  |
| 1. 3. 生体におけるCa <sup>2+</sup> の役割.....  | 6  |
| 1. 4. グルタミン酸受容体のアゴニスト.....   | 7  |
| 1. 5. イオン透過性と膜電位.....  | 9  |
| 1. 6. NMDA 受容体に対する光学異性体も含めたアミノ酸の効果.....  | 10 |
| 1. 7. 目的と意義.....   | 11 |
| <b>第 2 章 willardiine 応答におけるCa<sup>2+</sup>抑制効果</b>                               |    |
| 2. 1. 実験方法と解析方法.....   | 12 |
| 2. 1. 1. 細胞培養とトランスフェクション.....  | 12 |
| 2. 1. 2. パッチクランプによる測定方法.....   | 14 |
| 2. 1. 3. Ca <sup>2+</sup> とwillardiineの複合体の確認.....                               | 16 |
| 2. 1. 4. イオンの透過性の算出.....   | 17 |
| 2. 1. 5. 電流電圧曲線の作成.....  | 18 |
| 2. 1. 6. データの検定.....   | 18 |
| 2. 2. 結果.....  | 19 |
| 2. 2. 1. GluR6(Q)/KA-2サブユニットの共発現を必要とするwillardiine応答.....                         | 19 |
| 2. 2. 2. willardiine濃度と応答電流の関係とCa <sup>2+</sup> による効果.....                       | 19 |
| 2. 2. 3. willardiine応答電流に対するCa <sup>2+</sup> の抑制.....                            | 21 |
| 2. 2. 4. 反転電位とNaCl濃度との関係.....  | 21 |
| 2. 2. 5. Na-free 細胞外液におけるwillardiineに対する無応答.....                                 | 23 |
| 2. 2. 6. Na <sup>+</sup> とCa <sup>2+</sup> が混在している場合のCa <sup>2+</sup> の非透過性..... | 25 |
| 2. 2. 7. 二価イオンによる抑制効果.....   | 27 |
| 2. 2. 8. Ca <sup>2+</sup> とwillardiineとの複合体.....                                 | 27 |
| 2. 3. 考察.....  | 30 |
| 2. 3. 1. 神経細胞におけるwillardiineの効果.....   | 30 |
| 2. 3. 2. willardiine応答電流における脱感作.....   | 30 |
| 2. 3. 3. Con Aによる効果.....   | 30 |
| 2. 3. 4. ポリアミンによる整流特性とCa <sup>2+</sup> による抑制効果の関係.....                           | 30 |
| 2. 3. 5. イオン透過性.....   | 31 |
| 2. 3. 6. 二価イオンによる電流調節.....   | 31 |
| 2. 3. 7. Ca <sup>2+</sup> 効果の機構仮説.....   | 32 |
| 2. 4. まとめ.....   | 33 |
| <b>第 3 章 NMDA受容体における各種アミノ酸効果</b>   |    |
| 3. 1. 実験方法.....  | 36 |
| 3. 2. 結果.....  | 37 |
| 3. 2. 考察.....  | 37 |
| 謝辞.....  | 42 |
| 参考文献.....  | 43 |
| 付録1: 調製溶液類.....  | 47 |
| 付録2: シナプス前終末からの伝達物質放出機構.....   | 49 |

## 要約

人体における最後の未知の領域と言われる脳。その最も複雑で多彩な機能は数百億個ともいわれる神経細胞の絡み合いにより成り立っている。それらの神経細胞のつながりの部分をシナプスとよぶ。そのシナプス間の連絡は主に神経伝達物質の受け渡しにより行われる。伝達物質を送る側をシナプス前膜、受け取る側をシナプス後膜という。シナプス後膜において、伝達物質を受容し穴を開けてイオン電流を通す膜蛋白質が、イオン透過性受容体チャネルである。チャネルから流入したイオン電流は、神経細胞内の脱分極や過分極等の電位変化や、細胞内の多様な代謝を引き起こす。以上のように受容体チャネルは神経科学において重要な膜蛋白質の一種である。アミノ酸受容体は、広範な神経系において神経伝達を担う伝達物質受容体であり、分子構造からいくつかのサブタイプに分けられる。

本論分は次の構成からなっている。

第1章は、アミノ酸受容体の分類と主な作用薬、神経伝達におけるカルシウムイオンの重要性、また、アミノ酸の光学異性体の存在とNMDA受容体との関係について解説し、研究背景と研究するに至った経緯および研究目的を述べている。

第2章は、興奮性チャネル連結型アミノ酸受容体の中のカイニン酸受容体 GluR6(Q) と KA-2 の二種類のサブユニット形成する受容体イオンチャネルに対して、作用薬 willardiine を投与した際に流れるイオン電流のイオン種が主にナトリウムイオンである事をあきらかにすると共に、細胞外のカルシウムイオンがこのイオン電流を抑制する事を記載している。カイニン酸受容体は海馬の記憶機構などの重要な神経機能に関与しており、カルシウムイオンがこの受容体チャネルをどのような条件下で通過するか、またどのような薬物がカルシウムイオン透過性を修飾するか等の研究が求められていた。

第2-1章は、実験方法を記述している。アミノ酸受容体 cDNA と蛍光マーカーである GFP の cDNA を発現ベクターに組み込み、リポフェクトアミン法をもちいて HEK293 細胞株に取り込ませ、受容体および GFP 蛋白をこの細胞株に発現させた。そして、パッチクランプ法の一つであるホールセル（全細胞）法を用いて膜イオン電流を測定した。

第2-2章は、次の結果を記述している。

- (1) 作用薬 willardiine を投与した時に膜イオン電流が惹起されるためには、GluR6(Q) サブユニットと KA-2 サブユニットの両方が同一細胞上に発現している事が必要であり、両者が複合体を形成して初めて willardiine 感受性を持つ。
- (2) willardiine により惹起される電流 (willardiine 電流と略記) は、細胞外のカルシウムイオン濃度を上昇するに従い、より多く抑制された。また、カルシウムイオンは、電流を willardiine に対して非競合的に抑制した。
- (3) 細胞外液のナトリウムイオン濃度を上げると、willardiine 電流の反転電位が正方向に移動する

ことから、Goldman-Hodgkin-Katz 式を仮定すると willardiine 電流はナトリウムイオンを含むと結論した。一方、細胞外液のカルシウムイオン濃度を上げても、willardiine 電流の反転電位に変化が見られないことから、willardiine 電流はカルシウムをほとんど含まない。

(4) 細胞外液のカルシウムイオンと willardiine が複合体を形成して willardiine 濃度が減少することが、「見かけ上のカルシウムイオンによる抑制」をもたらすのではないかという可能性を検討するために、種々の濃度の willardiine とカルシウムイオンを共存した液中のカルシウムイオン濃度をカルシウム感受性電極で測定しところ、両者の複合体形成は無視できるほどに小さい事が示された。

(5) カルシウムイオン以外の二荷イオンとしてマグネシウム、バリウム、亜鉛の効果も解析し、亜鉛の抑制効果が一番大きいことを明らかにした。

第 2-3, 2-4 章においては、カルシウムイオンによる抑制機構の考えられるモデル、およびまとめを記している。

上記の(1)-(3)の結果は既に報告されている他の作用薬であるカイニン酸投与による膜イオン電流の性質とは大きく異なっており、カイニン受容体チャネルの新しい調節機構の存在が明らかにされた。

第 3 章では、NMDA受容体の光学異性体も含めた各種アミノ酸に対する効果を調べるために、*Xenopus*卵母細胞にmRNAを注入し受容体を発現させた後、二電極電位固定法を用いて解析した。その結果、アラニン、セリン、システインがグルタミン酸応答を増強し、さらに光学異性体のD型のアミノ酸がL型よりも大きな増強効果を持つ傾向があることをあきらかにした。NMDA受容体は、記憶や学習の基本的な機構単位としての海馬における長期増強・抑制の機構に大きく関わる重要な受容体であり、グリシン以外のアミノ酸による応答電流の調節効果の研究が求められていた。

付録において、シナプス前膜側の神経伝達物質放出機構について述べた。

## 1. 序論

### 1. 1. アミノ酸受容体チャネルの分類

2000g足らずの人間の脳には1000億もの神経細胞（ニューロン）があり、それぞれのニューロンが軸索や樹状突起を伸ばし複雑に絡み合っている。その神経同士のつなぎ目はシナプス（ギリシア語で「しっかりとからみつく」の意味）と呼ばれる。そのシナプスにおいて、神経間の連絡が化学物質の受け渡しによって行われる。情報を送る側の神経の末端部（シナプス前膜）から神経伝達物質と呼ばれる化学物質が放出され、情報を送られる細胞側の細胞膜（シナプス後膜）に受け取られる。

伝達物質を受容する膜蛋白質には様々な種類があり、その中にはアミノ酸を受容するものもある。アミノ酸受容体は、伝達物質の種類によって、興奮性のグルタミン酸受容体(Dingledineら 1999)や、抑制性のGABA受容体(Shingaiら1996)、グルシン受容体に分類される。本稿では、興奮性のグルタミン酸受容体チャネルについて研究を行った。

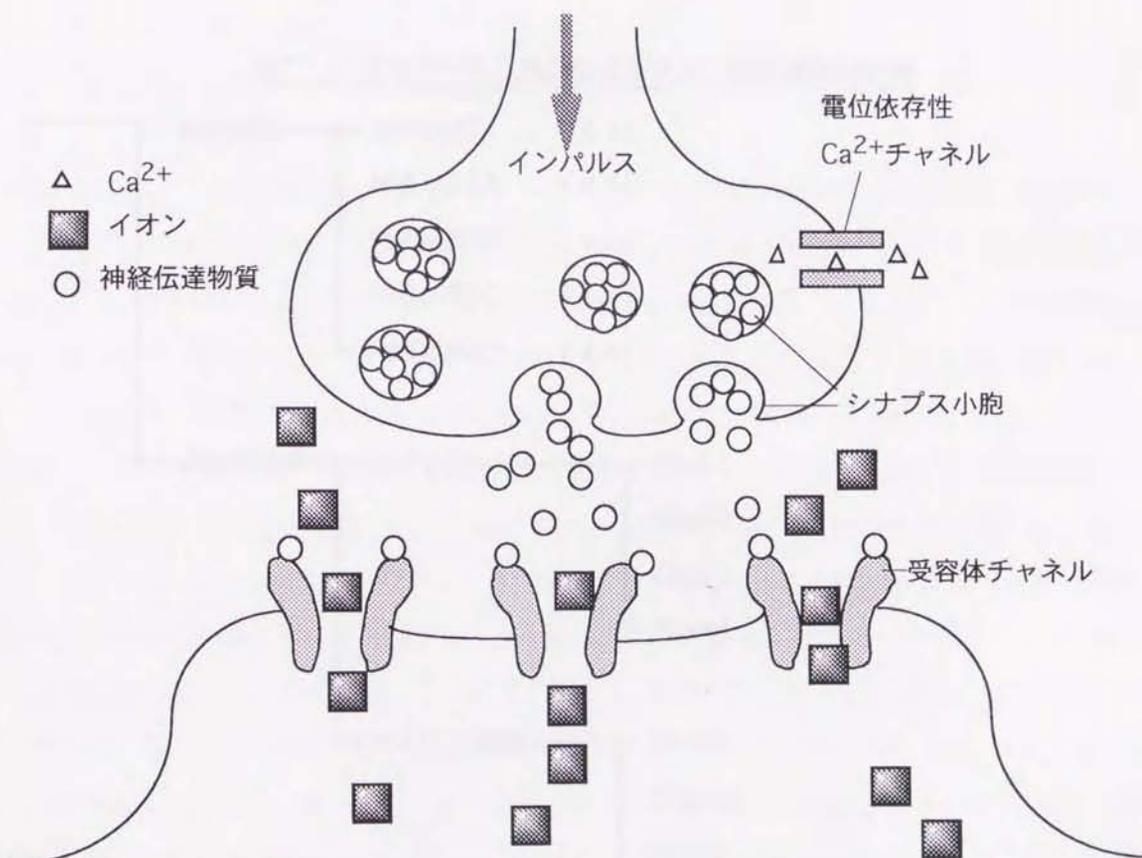


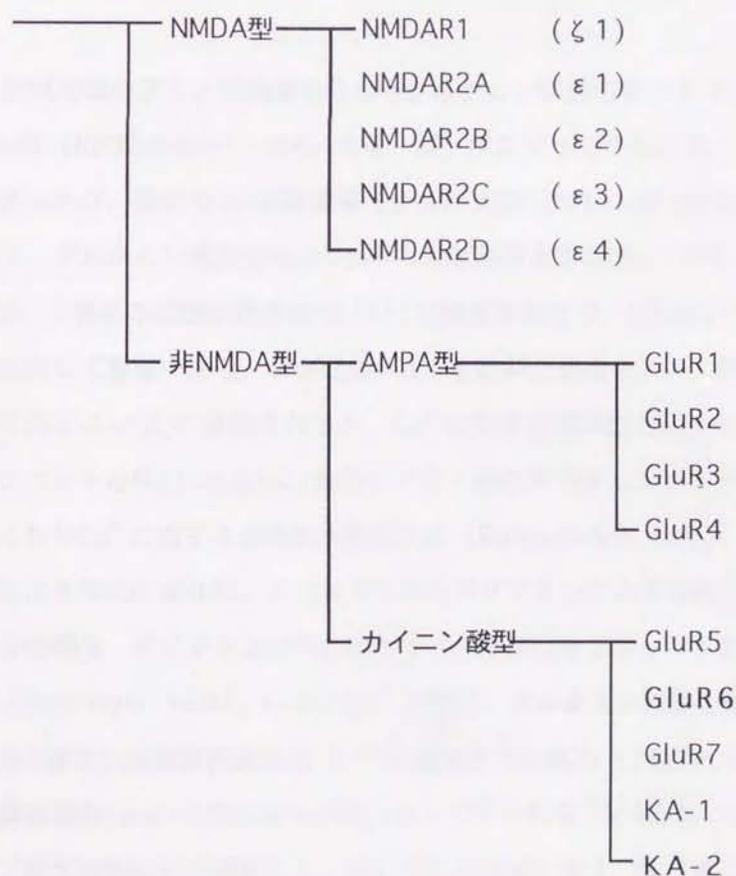
図1：シナプスの概念図

シナプス前膜側にインパルスが送られてくると、電位が変化する事によって電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルが開きCa<sup>2+</sup>が流入する。流入したCa<sup>2+</sup>が引き金となって、神経伝達物質を含むシナプス小胞が膜に融合して伝達物質を放出する。放出された伝達物質はシナプス後膜側の受容体チャネルに結合する。伝達物質を結合した受容体は、チャネルを開き細胞にイオンを流入（流出）させる。流入したイオンは、細胞内の電位の変化や、細胞内情報伝達系の活性化をおこす。

グルタミン酸受容体は、記憶と学習の基礎となるシナプス可塑性の発現および、脳虚血やてんかんなどの病態で発生する神経細胞壊死などに深く関わっていることが示唆されている。従って、グルタミン酸受容体の分子構造と機能の解明が、中枢における神経情報の伝達機構、脳の病態の理解に必須であると考えられる。その重要性ゆえに、グルタミン酸受容体について多くの薬理的および生理学的研究が積み重ねられてきた。

イオンチャネル連結型グルタミン酸受容体は、薬理的性質によってまず、NMDA型、非NMDA型に分類される。NMDA型は、サブユニットの種類によって、マウスの $\zeta$ 1（ラット由来のNR1に対応する）、 $\epsilon$ 1-4（ラット由来のNR2A-Dに対応する）に分類される(Dingledineら 1999)。また、非NMDA型はAMPA型とカイニン酸型に分類される。さらに、AMPA型はGluR1-4、カイニン酸型はGluR5-7, KA-1, KA-2に分類される(Dingledineら 1999)。生体膜において受容体は、単独ではなく複数のサブユニットが重合して機能する。

表1：イオンチャネル連結型グルタミン酸受容体の分類



## 1. 2. 分子構造

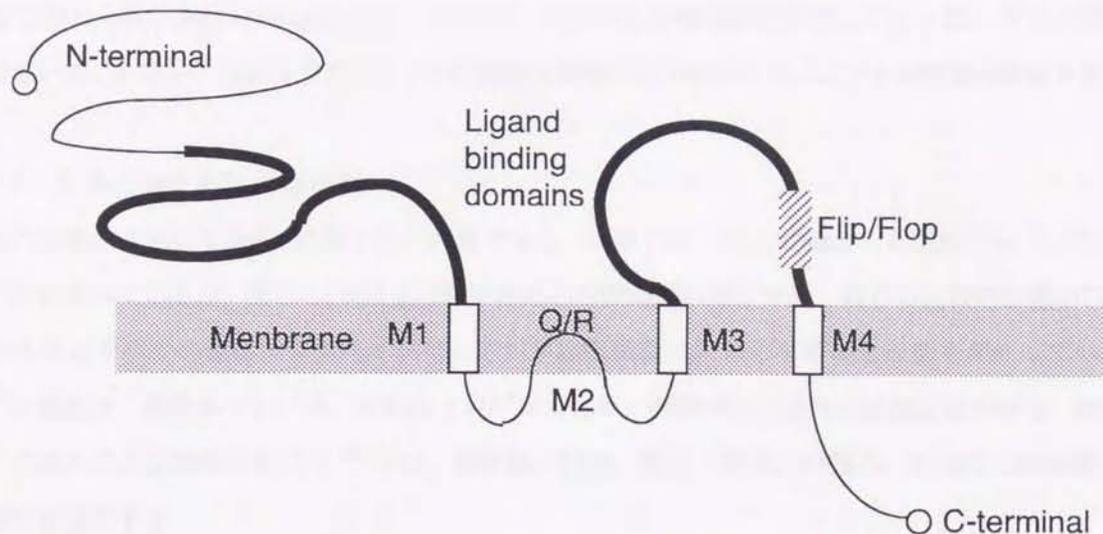


図2：グルタミン酸受容体の3回膜貫通トポロジーモデル

約900個のアミノ酸残基からなるグルタミン酸受容体サブユニットのC末端の側には疎水性の高い4ヶ所（N末端からM1～M4）ある。膜トポロジーモデルには、3回膜貫通モデルと4回膜貫通モデルがあったが、最近では3回膜貫通モデルが支持されている(Hollmannら 1994)。3回膜貫通モデルでは、グルタミン酸受容体は3ヶ所の仮想膜貫通部位(M1, M3, M4)を持つ。N末端が細胞外に存在する。2番目の仮想膜貫通部位(M2)は膜を貫通せず、C末端が細胞内に存在する。M2はイオン透過性に対して重要である。GluR2のM2にある621番目のアミノ酸のグルタミン(Q)がRNA編集によってアルギニン(R)に置換されると、 $\text{Ca}^{2+}$ に対する透過性が無くなる(Sommerら 1991)。GluR6サブユニットのM2にある621番目のアミノ酸のグルタミンがアルギニンに変わると、内向き整流性がなくなり $\text{Ca}^{2+}$ に対する透過性も変化する(Burnashevら 1995, Sommerら 1991)。アミノ酸の置換による特性の変化は、スペルミン等のポリアミンによるものであり、621番目のアミノ酸がグルタミンの場合、ポリアミンが受容体のチャネル部位をブロックする事によって整流特性が生じるのである(Behringら 1997, Kambojら 1995)。グルタミン酸等を結合するリガンド結合部位は、N末端から1番目の仮想膜貫通部位(M1)の直前までの部分と3番目の仮想膜貫通部位(M3)と4番目の仮想膜貫通部位(M4)の間の部分が絡み合って作られる。M4直前にあるFlip-flop領域は、いくつかのアミノ酸が同時にRNA編集により変化される領域であり、脱感作に影響を与える。GluR2サブユニットのこの領域中の754番目のセリン(flip)をアスパラギン酸(flop)に代えると、応答増強剤のCyclothiazideに対するアロステリック効果に変化する(Sommerら 1990)。GluR6サブユニットでもこの領域を人工的に代えることによって、Cyclothiazideに対するアロステリック効果を持つよ

うになる (Partinら 1995). GluR2サブユニットの膜外領域は結晶解析されており, 分子構造が詳細に調べられている (Armstrongら 1998). グルタミン酸受容体サブユニットは, アミノ酸配列が似ていることから, GluR2サブユニットの構造を参考にして他のサブユニットの構造も類推できる.

### 1. 3. 生体におけるCa<sup>2+</sup>の役割

Ca<sup>2+</sup>は生体において5番目に量の多い元素である. 人体には, 成人の場合, 1,000 ~ 1,200gのCa<sup>2+</sup>が含まれているが, その95%以上は骨や歯などの硬組織に存在する. 残りの比較的少量のCa<sup>2+</sup>が細胞外液とすべての細胞に含まれていて, それが細胞機能にきわめて重要な役割を果たしている. Ca<sup>2+</sup>の濃度は, 細胞外で10<sup>-3</sup>M, 細胞内で10<sup>-7</sup>Mであり, 細胞内外での大きな濃度差がある. 微量なCa<sup>2+</sup>の流入による濃度上昇(10<sup>-6</sup>~<sup>-5</sup>)は, 筋収縮, 代謝, 発生, 免疫, 神経系, 分泌などの多彩な生体機能を調節する.

Ca<sup>2+</sup>のグルタミン酸受容体に対する主な役割には, (1)電流成分と(2)調節の二つがある. (1)電流成分の役割は受容体のチャネルを通り細胞内外に流入・流出して, 細胞内の電位を変化させたり, Ca<sup>2+</sup>依存性の細胞内伝達経路を活性化させたりすることである. (2)調節の役割は, 応答電流の大きさを増強・抑制することである.

グルタミン酸受容体の電流成分としてのCa<sup>2+</sup>の流入は, 記憶や学習の基礎となるシナプス可塑性において重要である. 可塑性とは, 粘土細工のように一度作られた形がそのまま保持されることであり, ゴムのように前の状態に戻らないことである. シナプスにおける可塑性とは, 一度形成されたシナプスがそのまま保持されることである. 前の状態が保たれるということは, 「記憶」されることである. 可塑性には大きくわけて, 二つの種類がある. 長期増強と長期抑制である. 長期増強とはシナプスの機能が増強されたまま長時間保持されることである. 長期抑制はその逆である. 一般的な長期増強の機構は以下のように説明される.

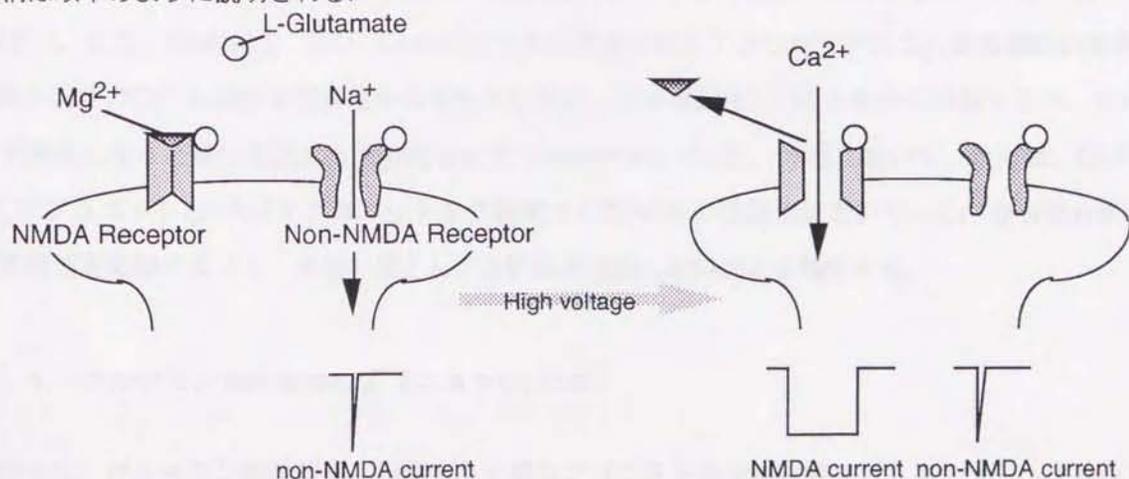


図3: シナプスの長期増強モデル

NMDA型の受容体は $\text{Ca}^{2+}$ に対して大きな透過性を持ち、脱感作が少ない。すなわち、NMDA型の受容体がチャネルを開口させた場合、多量の $\text{Ca}^{2+}$ が長時間細胞内に流入する。非NMDA型受容体はNMDA型受容体よりも $\text{Ca}^{2+}$ の透過性が低く、電流応答の脱感作が大きく素早いため少量で短時間の $\text{Ca}^{2+}$ の流入しかない。通常の細胞内電位では、NMDA型受容体は細胞外液の $\text{Mg}^{2+}$ によってブロックされているため、興奮性伝達物質であるL-グルタミン酸を受容しても $\text{Ca}^{2+}$ 等のイオンがほとんど透過しない。通常の興奮ではNMDA型受容体は機能せず、興奮作用は非NMDA型受容体が $\text{Na}^+$ を通すことによって生じる。しかし、非NMDA型受容体を介して流入した多量の $\text{Na}^+$ により細胞内電位の大きな上昇（脱分極）がおきると、 $\text{Mg}^{2+}$ のNMDA受容体のブロックが外れて多量の $\text{Ca}^{2+}$ が細胞内に流入する。そして、NMDA型受容体を介して流入した $\text{Ca}^{2+}$ が様々な細胞内情報伝達系を活性化させる。そのことによって蛋白の発現や遺伝子の調節がおこる。シナプスの長期増強はNMDA型と非NMDA型の役割分担によって行われていると考えることができる。

上記のように、これまで、 $\text{Ca}^{2+}$ を透過するのは主にNMDA型であるという説が有力であったが、最近、非NMDA型受容体も $\text{Ca}^{2+}$ を透過させるということが明らかになってき(linoら1990, Kohlerら1993, Burnashevら1995)。HEK 293細胞におけるGluR6(Q)及びGluR6(R)単独発現の場合、 $\text{Ca}^{2+}$ の透過性が細胞外側の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度に依存する。生理的濃度の1.8 mMにおいて、GluR6(Q)の単独発現における $\text{Ca}^{2+}$ の透過性はGluR6(R)の単独発現の場合よりも大きい(Burnashevら1995)、高濃度の102, 110 mMにおいては逆である(Burnashevら1995, Kohlerら1993)。さらに、GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを共発現させたHEK 293培養細胞における $\text{Ca}^{2+}$ の透過性が観察されている(Kambojら1995)。

$\text{Ca}^{2+}$ は非-NMDA型受容体を透過するだけでなく、電流の大きさを調節する役割を持つ。脊髄の三叉神経のカイニン酸応答において、 $\text{Ca}^{2+}$ は透過するだけでなく電流を抑制する(GuとHuang1991)。また、GluR6(Q)及びGluR6(R)を単独発現させたアフリカツメガエル卵母細胞の場合、細胞外液中の $\text{Ca}^{2+}$ の濃度を低濃度から変化させると、応答電流を2 mMで最大に抑制するが、それ以上の濃度になると逆に増強する(EgebjergとHeinemann1993)。本稿において、我々は、GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを共発現させたHEK-293細胞において、 $\text{Ca}^{2+}$ がwillardiine応答電流を抑制すること、また、ほとんど受容体を透過しないことを報告する。

#### 1. 4. グルタミン酸受容体のアゴニスト(作用薬)

図4に、グルタミン酸受容体に結合する主要なアゴニストを示す。各アゴニストは、L-グルタミ

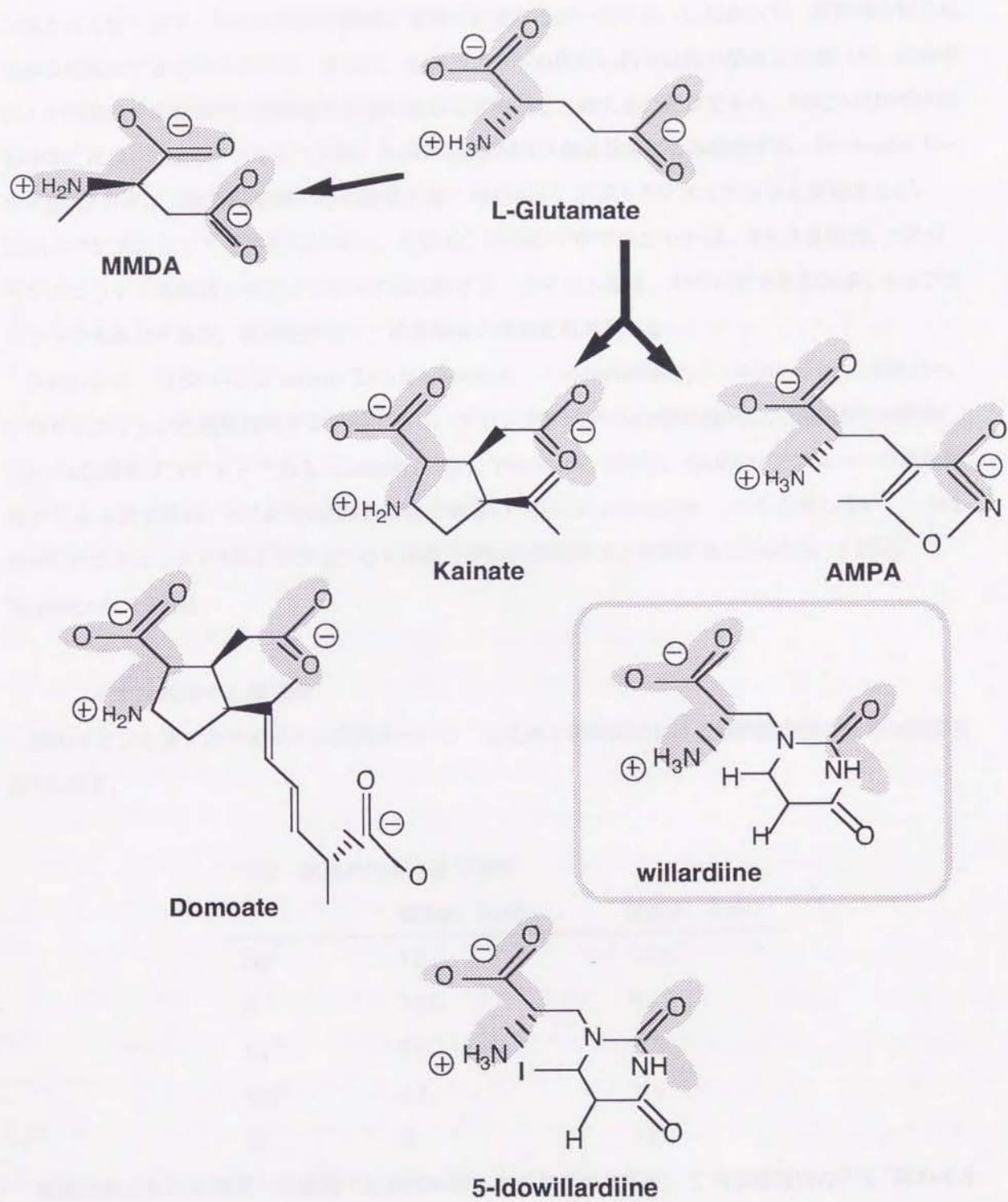


図4：各種アゴニストの化学構造式  
 灰色の部分は受容体結合次に重要な共通部分を示す。

ン酸とよく似ており、灰色の部分の構造と電荷の配置がほぼ一致する。したがって、受容体の同じ結合部位に結合すると考えられる。さらに、各アゴニストの灰色の部分以外の構造上の違いが、結合部位との親和性や応答電流の経時変化の違いをおこす要因だと考えることができる。NMDAはNMDA型受容体にだけ、Kainate（カイニン酸）やAMPAは非NMDA型受容体にも結合する。Domoate（ドモイ酸）はカイニン酸型受容体にも結合する。AMPAは、GluR1-5サブユニットと反応するが、GluR6-7サブユニットとは反応しない。しかし、GluR6-7サブユニットは、KA-1または、KA-2サブユニットと共発現させるとAMPAにも応答する。カイニン酸は、AMPA型であるGluR1-4サブユニットにも結合するが、親和性が低く、応答電流の経時変化も異なる。

Willardiine [(S)-1-2(2-amino-2-carboxyethyl) pyrimidine-2, 4-dione]は、天然のヘテロサイクリックな興奮性のアミノ酸であり、アカシアやMimosaの種に存在し、選択的なAMPA/kainate受容体アゴニストである (Gmelin 1961, Patneauら1992)。GluR6サブユニットの単独発現からなる受容体は、willardiineの類似体である(S)-5-Iodowillardiine にも応答しない。しかし、GluR6サブユニットとKA-2サブユニットが両方同時に発現すると応答する (Herbら, 1992, Swansonら 1998)。

### 1. 5. イオン透過性と膜電位

膜のイオンを通す能力をイオン透過性という。ほ乳類の骨格筋における細胞膜内外のイオン濃度を表1に示す。

表2：細胞内外のイオン濃度

|                  | 細胞内 (mM)         | 細胞外 (mM) |
|------------------|------------------|----------|
| Na <sup>+</sup>  | 12               | 145      |
| K <sup>+</sup>   | 155              | 4        |
| Ca <sup>2+</sup> | 10 <sup>-7</sup> | 2.5      |
| Mg <sup>2+</sup> | 31               | 1.5      |
| Cl <sup>-</sup>  | 4                | 120      |

細胞内外ともに正電荷と負電荷の総濃度の間に大きな差があるが、これは細胞内のPO<sub>4</sub><sup>-3</sup>等のイオンが省略されている為である。実際には内外ともにそれぞれ正と負の電荷数は等しく電気的中性が保たれている。

静止膜電位はどのように決まるのか？

静止膜電位である平衡電位は、各イオンの濃度と透過性、つまり、濃度勾配と電位勾配のバランス

で決まる。それらの関係から平衡電位を導き出す式がGoldman-Hodgkin-Katzの式である。

$$E_m = RT/F \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na^+]_o + P_k[K^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_{Na}[Na^+]_i + P_k[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

Rは気体定数, Tは絶対温度, Fはファラデー係数,  $E_m$ は平衡電位, Pは透過係数, [ ]は濃度, iは細胞内, oは細胞外を表す。濃度は表1の値か, 実験時の細胞外液や細胞内液の組成から代入される。 $E_m$ は平衡電位であり, 見かけ上の電流が0になる電位である。つまり, それは電流-電圧曲線上にある反転電位であるので, その反転電位を代入する。透過係数はチャンネルの種類によって異なる。そして, 式に平衡電位とイオンの濃度を代入すれば, チャンネルの透過係数を求めることができる。

この式を利用するにはいくつかの前提条件を理解した上で使用する必要がある。条件を以下に記す。

- (1)膜の中の電位勾配が一定である
- (2)膜相内の両界面間の電位差が実際に測定されている膜電位に等しい
- (3)溶液-膜界面における膜相内のイオン濃度が膜に接する溶液のイオン濃度に比例する

#### 1. 6. NMDA 受容体に対する光学異性体も含めたアミノ酸の効果

N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は, 様々な調節部位を持ち(Yoneda & Ogita 1991, Gasic & Hollmann 1992, Nakanishi 1992, Wisden & Seeburg 1993), それらの部位の一つとして, 受容体の興奮を起こすために重要な部位であるグリシン結合部位がある。ナノモル濃度のグリシンはNMDA受容体チャンネルの開口確率を増強させる(Johnson & Ascher 1987, Kleckner & Dingledine 1988)。そして, グリシンと構造的に似ているいくつかの物質がグリシン結合部位に相互作用し, NMDA受容体を活性化させる。

蛋白に含まれるグリシン以外の20個のアミノ酸には, 光学異性体としてL型とD型が存在する。それらのアミノ酸の一つであるセリンは, ヒトと齧歯類の脳の中にD型としても存在し(Chouinard ら1993, Hashimoto ら1993, Hashimoto ら1993, Kumashiro ら1993), グルタミン酸作動性の機能を調節する(Fadda ら1988, Schell ら1995)。ラット脳で, L-セリンからD-セリンを産出する酵素のセリンラセマーゼが精製されており, 他のアミノ酸に比べてやはりセリンに対して大きな特異性を持つことが報告されている(Wolosker ら1999)。齧歯類の脳メッセンジャーRNAを注入された *Xenopus* (アフリカツメガエル) 卵母細胞における NMDA 受容体の電気生理学的解析(Mcbain ら1989)と, アゴニストと受容体結合部位との結合能的解析(Keith ら1989)は, セリンとアラニンがグリシン結合部位に結合し, NMDA 受容体を制御することを示す。さらに, D型のセリンとアラニンは, それぞれのL型よりも強力であることをあきらかにする。

D型のセリンは, *Xenopus* 卵母細胞に発現されたクローン化 NMDA 受容体のL-グルタミン酸応

答を増強させる(Matui ら 1995). 何人かの研究者は, サブユニットの特異的な形の機能的な性質を明らかにするために, クローン化 NMDA 受容体の発現系を使用している(Matsui ら 1995, Moriyoshi ら 1991, Kutsuwada ら 1992, Megro ら 1992, Monyer ら 1992). 彼らは, 様々なサブユニットの組み合わせを行い, NMDA 受容体のグリシンとD-セリンに対する応答の比較を行った. そして, 脳内のD型セリンの濃度は, 受容体を活性化させるのに十分に高いことをあきらかにした.

### 1. 7. 目的と意義

第二章の目的は, GluR6(Q)/KA-2サブユニットからなるグルタミン酸受容体のwillardiine応答電流に対する $Ca^{2+}$ 効果を調べることである.

willardiineは, AMPA/カイニン酸受容体の選択的アゴニストなので, 生体中での神経細胞における受容体の同定において大変有効な物質である. したがって, 本稿の結果は神経細胞のAMPA/カイニン酸受容体の実験に貢献できる. また, GluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体のグルタミン酸応答は, 素早い脱感作を持った持続時間の短い応答であるが, 本稿におけるwillardiine応答は持続するので, 測定しやすいという利点がある.

$Ca^{2+}$ は, 筋収縮, 代謝, 発生, 免疫, 神経系, 分泌などの多彩な生体機能を調節する. 神経系においては, グルタミン酸受容体を介して, 記憶と学習の基礎となるシナプス可塑性の発現および脳虚血やてんかんなどの病態で発生する神経細胞壊死などに深く関わっていることが示唆されている. 従って,  $Ca^{2+}$ とグルタミン酸受容体との関係の解明が, 中枢における神経情報の伝達機構, 脳の病態の理解に必須であると考えられる.

第三章の目的は, NMDA受容体の18種類のアミノ酸それぞれのD型, L型に対する活性の違いを明らかにすることである. そのために, マウスのNMDA受容体のメッセンジャーRNAを*Xenopus*卵母細胞に注入することにより受容体を発現させ, 電気生理学的解析を行った. その結果より, D型の方がL型よりもアラニン, セリン, システインがグルタミン酸応答をより大きく増強させたことをあきらかにする.

## 2. 1. willardiine応答におけるCa<sup>2+</sup>抑制効果の解析用の実験方法

### 2. 1. 1.細胞培養とトランスフェクション

受容体を測定するための試料確保には、主に、実際の神経細胞を使う方法と、神経細胞ではない細胞に人工的に発現させる方法がある。人工的に発現させる細胞としては、アフリカツメガエルの卵母細胞や株細胞がある。神経細胞の系は一番生体内に近い状況であり、受容体の発現も豊富であるので応答電流を記録しやすい。しかし、類似の受容体や未知の受容体の存在の可能性があるため、目的の受容体に焦点を当てるのが困難である。卵母細胞の系では、二電極電位固定法という測定方法が比較的容易であり、細胞そのものが大きいので応答電流も大きく、細胞内に物質を注入するのに有利である。しかし、発現効率が季節等により変動するといった不安定な短所もある。また、GluR6(Q)サブユニットからなる受容体における、カイニン酸に対する素早い脱感作を持った応答電流の様な急速に変化する電流の測定には適さない。株細胞は、人工的に目的蛋白を発現させることができるので目的蛋白の応答に焦点を当てやすい。また、細胞が小さいので電位固定の空間的誤差が小さく、また細胞外液の切換を素早く行うことができる。それによって、素早い脱感作を持った応答を測定することができる。しかし、細胞の種類によって、発現効率が低くなることや、パッチクランプ法による測定の場合にギガシールの作成が困難な場合もある。最近ではHEK 293細胞というヒトの胎児の腎臓由来の株細胞がよく使用されている。長所として、リン酸カルシウム法等のトランスフェクション（遺伝子導入）の効率が良いこと、ギガシールを作成しやすいのでパッチクランプ法に適していることが挙げられる。上記の理由から、本研究ではHEK 293細胞を使用した。

ヒトの胎児の腎臓由来のHEK 293細胞を、ATCC (Rockville, MD)より購入した。細胞培養液として10%の新生仔牛血清(NCS)を含む市販のDMEM培地（ニッスイ）を使用した（付録参照）。細胞培養を、温度が37℃、5% CO<sub>2</sub>に保持されているインキュベーターの中で行った。

### リポフェクトアミン法による遺伝子導入：トランスフェクション

#### 原理

目的蛋白質を発現させるためには、その目的遺伝子をコードしている遺伝子を細胞の中に入れなければならない。しかし、DNA単独では細胞に取り込まれない。そこでいくつかの方法があり、本稿ではその中のリポフェクトアミン法を使用した。リポフェクトアミン(Gibco BRL)は、正電荷を持つ合成脂質である。目的蛋白の設計図に当たるDNAが負電荷を持つので、DNAとリポフェクトアミンを混合するとお互いの電荷により複合体を形成する。複合体は、細胞の貪食作用（エンドサイトーシス）によって取り込まれる。取り込まれたDNAは核に入り、DNAの情報がメッセンジャーRNAに転写され、リボゾームがメッセンジャーRNAを読みとり目的蛋白を作成する。

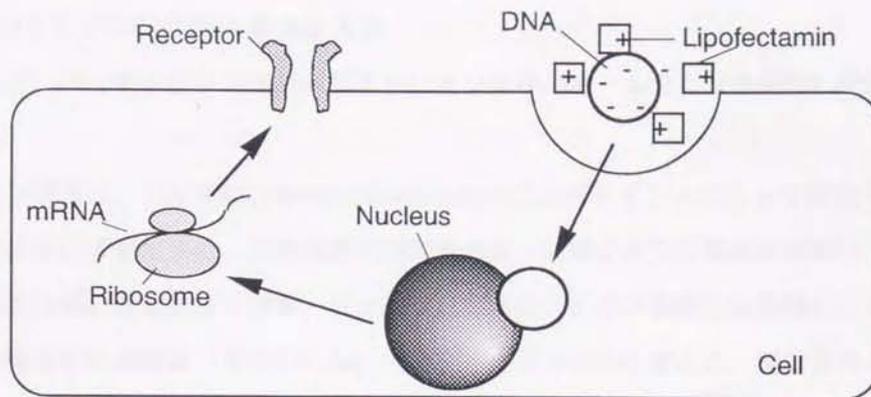


図5：リポフェクトアミンによる発現系の概念図

全ての細胞が目的蛋白を発現するわけではない。そこで、発現した細胞を同定するためにGreen fluorescent protein (GFP; Quantum)が使用された。GFPはクラゲ由来の蛋白であり、励起光(波長：490 nm)によって緑色に発光(波長：525 nm)する。細胞に害を与えないことや識別しやすさなどから広く使われている。プラスチック製の培養皿は励起光によって自家発光するので、GFPによる発光を識別するときにバックグラウンドノイズとなる。そこで、測定用の細胞を蛍光の無いカバーガラスの上に培養した。

#### 方法

- 1・細胞密度が皿の面積の40~60%になるまで培養した。
- 2・400  $\mu$ lのMEM培地にDNAを入れて混ぜた。

GluR6(Q)サブユニット, KA-2サブユニット, GFPをコードするDNAを2  $\mu$ g, 2  $\mu$ g, 1  $\mu$ gの割合で混合した。

- 3・10  $\mu$ lのリポフェクトアミンをDNAとMEMの混合液に入れて混ぜた。
- 4・30分間室温で放置した。
- 5・培養皿から培地を取り除き、リポフェクトアミン混合液と交換した。
- 6・4時間インキュベーター(培養器)で培養した。
- 7・リポフェクトアミン混合液を取り除き10% NCSを含んだDMEM培地と交換した。
- 8・一晩、培養した。
- 9・培地を取り除き、PBS/EDTA液(付録1参照)で洗浄した。
- 10・トリプシン/EDTA液(付録1参照)で細胞を皿から剥がし、バラバラにした。
- 11・測定用の直径15 mmのカバーガラスの入っている培養皿に細胞を移した。
- 12・一晩、あるいは二晩インキュベートした後、測定に使用した。

## 2. 1. 2. パッチクランプによる測定方法

測定法として、パッチクランプ法のバリエーションの中のホールセル（全細胞）記録法を用いた。  
原理

パッチクランプ法は、1976年にNeherとSackmanの二人のドイツ人によって開発された。パッチクランプ法の原理の重要な点は、二電極電位固定法のように微小ガラス電極を細胞に「刺す」ことではなく、電極の先端の開口部を「密着」させることである。ガラス電極を細胞膜にギガ・オーム以上の高抵抗で密着させた状態を「ギガシール」とよぶ。ギガシールになると、開口部内の微小膜領域（パッチ膜）が電氣的に他の領域と隔絶される。そして、シリンジ等で陰圧をかけたり、瞬間的（1~msec）に高電圧（300~mV）をかけてギガシールの状態のまま膜を破る。この状態から細胞内の電圧を固定して記録する方法がホールセル記録法である。二電極電位固定法と同じように、ホールセル記録法は細胞膜全体に発現している目的受容体の応答電流を測定する方法である。利点として、小さな細胞（数十 $\mu\text{m}$ ）の電流を測定することができること、及び、ギガシールにより漏れ電流が少ないので、正確に受容体の電流成分を単離できること等が挙げられる。

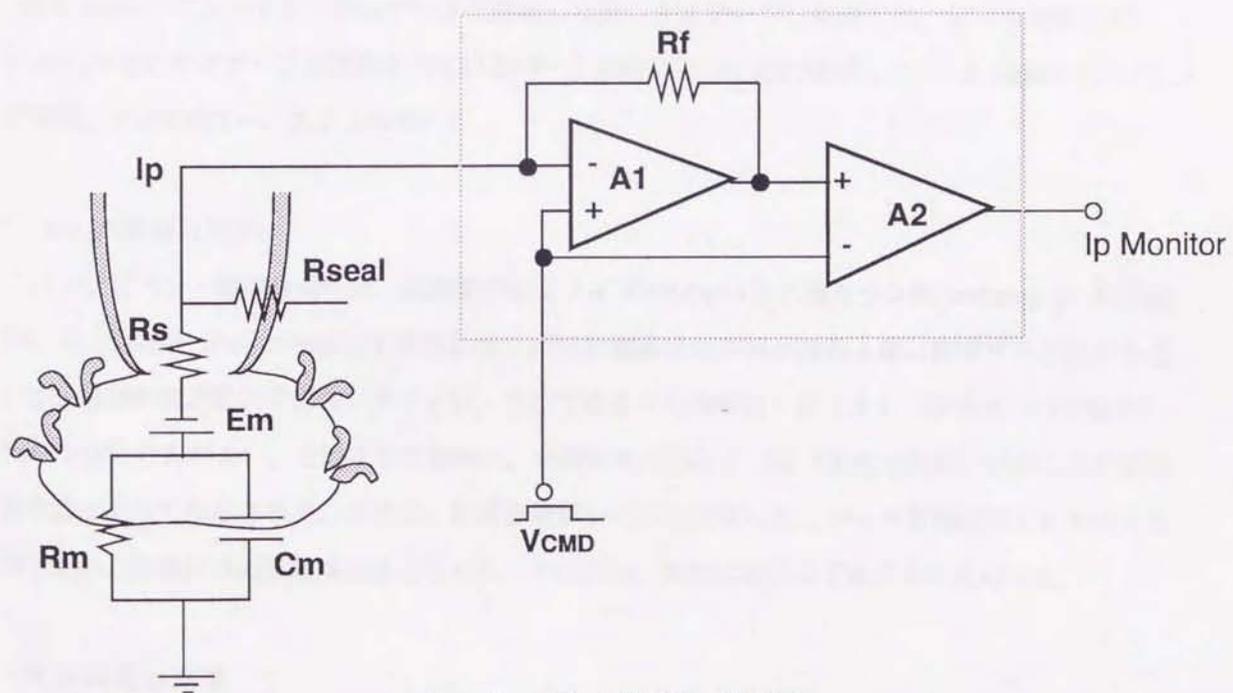


図6：ホールセル記録法の概念図

電流測定回路の基本構成を図6に示す。パッチクランプアンプのヘッドステージにある、OPアンプで構成されるI-Vコンバーターが、この測定回路の基本となる。高抵抗のフィードバック抵抗( $R_f$ )を用いるところに特徴がある。増幅器A1の反転入力 $V_p$ はOPアンプの性質により非反転電位入力( $V_{cmd}$ )と等電位となるよう電流が流れる。すなわち、電極内の電圧は指令電位となり、電極を流れる

電流（イオン電流）はすべて $R_f$ を流れる。A1の出力と $V_{CMD}$ の差は $R_f$ による電圧降下に比例することからイオン電流を測定できる。

$E_m$ は細胞内電位、 $C_m$ は膜容量、 $R_m$ が膜抵抗である。 $R_s$ は、パッチ膜抵抗に直列に入るシリーズ抵抗（アクセス抵抗）、 $R_{seal}$ はシール抵抗である。 $R_s$ は通常1-5 M $\Omega$ で、 $R_{seal}$ が10G $\Omega$ 以上となれば、 $I_p / I = R_{seal} / (R_s + R_{seal}) \sim 1$ となる。この $I_p$ をI-Vコンバータ（点線）内の高抵抗フィードバック抵抗( $R_f$ )における電圧降下として検出する。実際にはこのOPアンプ(A1)の出力には、膜電位成分も加わるので、これを次段のOPアンプ(A2)で差し引く。

## 方法

### ・測定機器

List社のEPC-7 パッチクランプアンプフィルターをDigi DATA 1200 インターフェース (Axon, Instrutech Corp.)を介してIBM PC AT互換機 CM5166DEI (Pro side)に接続した。解析用アプリケーションソフトpClamp6 (Axon Instrutech Corp.)を使用した。アナログ信号を、3 kHzのローパスフィルター (3 dB, digital Gaussian filter) に掛け、A/DコンバーターVR10 (Instrutech) によってデジタルデータに変換した後ビデオテープに記録した。データ解析には、pClamp6をビデオテープに記録されているデータを取り込むために使用した (1ミリ秒のサンプリング間隔, 3 kHzのローパスフィルター)。

### ・パッチ電極の製作

パッチピペット電極作成には、誘電率が低くノイズの少ないホウ素ガラス管 (catalog #: B150-86-10, Sutter Instruments)を使用した。パッチ電極を先端部が細胞上面に密着する必要があるため、先端形状が鋭利ではない方がよい。そしてなるべく先端近くまで太く（即ちテーパが短く） $R_s$ が小さいものがよい。そのような電極は、一段引きではなく二段（または数段）引きによる電極製作器によって作成された。通常は、先端直径が1~3 $\mu\text{m}$ であった。パッチ電極はほこりやゴミを嫌うため、先端付近の接触は厳禁とされる。そのため、直前に製作して当日中に使用した。

### ・電極内液の充填

ギガシールの障害となる塵を除去するために、注射筒にディスポーザブル（使い捨て用）のシリジフィルター(0.22 $\mu\text{m}$ )をつけたもので液を濾過した。電極液の充填方法には2段階あった。まず、ポリエチレン管を介して電極の尾部と注射筒とを連結した後、吸引して電極液で先端部を満たした。次に、ポリエチレン細管を用いて電極尾部より電極液を充填した。気泡がある場合は、尾部を軽く叩いて (tapping) 取り除いた。液を過剰に注入すると電極ホルダーに装着する際に電極液があふ

れ、電極ホルダー内部を濡らしてしまい、種々のトラブルの原因になる。このため注入する液量には注意を要する。電極内液（表 5）を注入されたときに10 MΩ程度の初期抵抗を持った。

#### ・薬液と投与

50 mM willardiine (Tocris)を原液作成のために、1 規定 (55 mM)のNaOH液に溶解した。測定毎に目的濃度になるように、原液を細胞外液に溶した。受容体への溶液の高速灌流は、ALA Scientific Instruments 社の高速灌流装置であるBPS-4 と BPS-8とによって行われた。このシステムの仕組みは、まず、12本のシリンジに接続されている電磁バルブが灌流を制御する。そして、それぞれが先端の直径が100 μmのチューブに集約され、そこから液を出す。それぞれの液には~6 psiの圧力が掛けられており、バルブが開いたときに細胞に対して素早く投与される。投与による細胞の位置のずれによる影響が無いことを、リガンドの含まれていない細胞外液を投与することによって確かめた。細胞外液の組成を表3に示す。全ての測定を室温の22~24°Cで行った。

#### ・Concanavalin A の付加

Concanavalin A (Con A)は、タチナタマメから精製されるレクチンの一種である。糖蛋白質との相互作用では、α-D-マンノース残基を含むアスパラギン結合型糖鎖と強く結合する。GluR6(R)を発現しているHEK 293 細胞において、Con Aによる脱感作の抑制と電流増強が報告されている (Partin ら 1993)。微小電流が増強されるか否かを調べるために、1.5 mg / ml Concanavalin A (Type IV, Sigma)を含む Normal 細胞外液に5 分間浸した後、測定を数回行った。

### 2. 1. 3. Ca<sup>2+</sup>とwillardiineの複合体の確認

Ca<sup>2+</sup>とカイニン酸の複合体が報告されている (Gu と Huang, 1991; Kambojら, 1995)。細胞外液中のCa<sup>2+</sup>とwillardiineが複合体を形成するかどうかを調べるために、我々は、Ca<sup>2+</sup>イオン電極 (TOA Electronic Ltd)を使って、遊離Ca<sup>2+</sup>をwillardiineで滴定した。もし、willardiine も Ca<sup>2+</sup>との複合体を形成するのであれば、遊離willardiine ([W]<sub>free</sub>)の濃度は以下の式から与えられるはずである。

$$[W]_{\text{free}} = [W]_{\text{total}} - [W]_{\text{bound}}, \quad [W]_{\text{bound}} = [W]_{\text{free}} \times [Ca^{2+}]_0 / K_{\text{diss}}$$

$K_{\text{diss}}$ は、Ca<sup>2+</sup>とwillardiineの複合体の解離定数である。[W]<sub>total</sub>は、使用されたwillardiineの濃度であり、[W]<sub>bound</sub>は、Ca<sup>2+</sup>と結合した濃度である。10-willardiineは、Ca-free 細胞外液中に10 mM willardiine を溶かした液であった (表3)。滴定において、10-willardiineが、9 mlの1-Ca 細胞外液 (表3) に加えられた。そして、総量が10mlになるまで、この操作を繰り返した。もし、willardiineがCa<sup>2+</sup>と複合体を作成しない場合は、最終的なCa<sup>2+</sup>とwillardiineの濃度は、それぞれ、

0.9 mM, 1 mM である。Ca-free細胞外液に10 mM のEDTAを溶かした10-EDTA 液と1-Ca 細胞外液を、電極のチェックのために使用した。

#### 2. 1. 4. イオンの透過性の算出

Cs<sup>+</sup>に対するNa<sup>+</sup>の透過比を得るために、 $P_{Na} / P_{Cs}$  を下記のGoldman-Hodgkin-Katzs の式から改変された式より算出した (Burnashev ら, 1996)。

$$P_{Na}/P_{Cs} = ([Cs^+]_i/[Na^+]_o) \exp(FV_{rev}/RT), \quad (1)$$

$V_{rev}$  は反転電位,  $[Na^+]_o$  と  $[Cs^+]_i$  は Na<sup>+</sup> と Cs<sup>+</sup> イオンの濃度, 'i' と 'o' はそれぞれ細胞内と細胞外, F, R と T は, ファラデー係数, 気体定数, 絶対温度である。

Goldman-Hodgkin-Katzs の式からの式(1)の導出

$$E_m = RT/F \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na^+]_o + P_K[K^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o}$$

まず, 受容体チャネルは, 陽イオンのみを透過させるとすると,  $P_{Cl}$  は0になるので,  $[Cl^-]$  の項が消えて以下のようになる。

$$E_m = RT/F \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na^+]_o + P_K[K^+]_o}{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i}$$

細胞外液をNaClのみからなる液とすると, K<sup>+</sup>が存在しないので,  $P_K[K^+]_o$  は消える。

$$E_m = RT/F \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na^+]_o}{P_{Na}[Na^+]_i + P_K[K^+]_i}$$

細胞内液が電極内液によって全て置換されたと仮定する。電極内液はNa<sup>+</sup>を含有せず, K<sup>+</sup>がCs<sup>+</sup>に置換されているので,  $P_{Na}[Na^+]_i$  の項が消え, K<sup>+</sup>がCs<sup>+</sup>に代わる。よって, 以下のようになる。

$$E_m = RT/F \cdot \ln \frac{P_{Na}[Na^+]_o}{P_{Cs}[Cs^+]_i}$$

両辺をRT/Fで割ると

$$FE_m / RT = \ln P_{Na} [Na^+]_o / P_{Cs} [Cs^+]_i$$

両辺の乗数を取り変形すると

$$\exp (FE_m / RT) = P_{Na} [Na^+]_o / P_{Cs} [Cs^+]_i$$

$$\exp (FE_m / RT) = P_{Na} / P_{Cs} \cdot [Na^+]_o / [Cs^+]_i$$

$$P_{Na} / P_{Cs} = \exp (FE_m / RT) \cdot [Na^+]_o / [Cs^+]_i$$

以上のように(1)が得られる。

#### 2. 1. 5. 電流電圧曲線の作成

電流電圧曲線を得るために、pClampにおいてプログラムされた-80 ~ +60 mV までの二秒間の電圧ランプを使用した。pClampの解析ソフトを使用して、willardiine存在下での電流電圧曲線からwillardiine非存在下での曲線を減算することにより正味の成分を抽出した。測定チェンバーにある参照電極を、通常記録用にはノーマル細胞外溶液(表3)によって満たし、ジャンクション電位を測定するために3 M KCl 溶液によって満たした。そして、塩化銀線を介してアンプフィルターに接続した。各細胞外液間のジャンクション電位を3 M KCl 液で充填した測定用電極測定し、基準となる細胞外液におけるジャンクション電位に対して規格化した。得られた反転電位を得られたジャンクション電位を使って補正した。

#### 2. 1. 6. データの検定

2. 2. 2. 節の0.18と1.8 mM  $Ca^{2+}$ を含む細胞外液における $EC_{50}$ 値を、Student's t-test で検定した。2. 2. 6. 節の各  $Ca^{2+}$  濃度間における反転電位の検定には、non-parametric Wilcoxon matched pairs signed-rank test を用いた。検定アプリケーションソフトとして Abacus Concepts StatView (Abacus Concept, Inc., Berkeley)を使用した。

## 2. 2. 結果

### 2. 2. 1. GluR6(Q)/KA-2サブユニットの共発現を必要とするwillardiine応答

GluR6(Q)サブユニットのみを発現している細胞は、カイニン酸には応答したが、willardiineには応答しなかった(図7. A)。対照的に、GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを共発現している細胞は、両方に対して応答した(図7. B)。すなわち、willardiineに応答するためには両方のサブユニットの共発現を必要とすることが明らかになった。

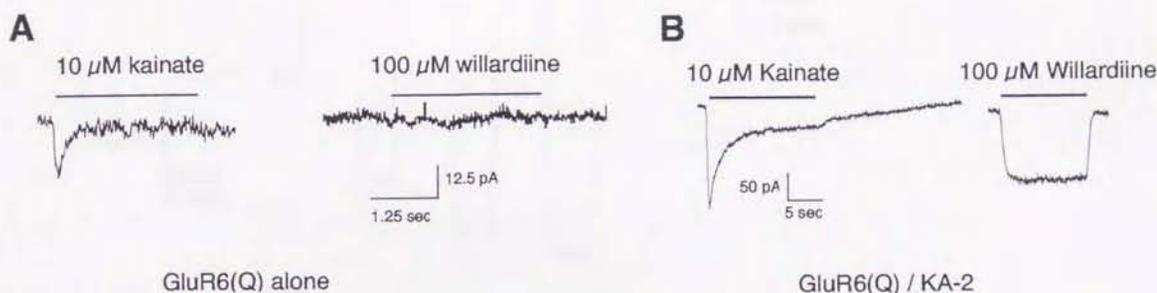


図7: GluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体におけるwillardiine応答電流  
(A) GluR6(Q)サブユニットのみを発現しているHEK 293細胞における10 μM カイニン酸と100 μM willardiineに対するホールセル電流。(B) GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを共発現しているHEK 293細胞における10 μM カイニン酸と100 μM willardiineに対するホールセル電流。細胞内電位を-80 mVに固定した。細胞外液はノーマル細胞外液であった。

### 2. 2. 2. willardiine濃度と応答電流の関係とCa<sup>2+</sup>による効果

アゴニストに対する受容体の感受性をあらわす目安としてEC<sub>50</sub>がある。EC<sub>50</sub>とは、最大応答電流の大きさが半分になるときのアゴニストの濃度である。EC<sub>50</sub>は大きいとき、つまり、濃度が高いということは、受容体が活性化するのに多数のアゴニストを必要とするわけであるから、それだけ受容体のアゴニストに対する感受性が低いということを示す。逆にEC<sub>50</sub>が小さいほど感受性が高いということである。Hill 係数は活性に必要なアゴニストとの結合部位の数の目安である。

Willardiineの濃度と応答の関係を知るために、willardiineの濃度を変化させつつ応答電流を測定した。さらに細胞外液中のCa<sup>2+</sup>の濃度も変化させ、Ca<sup>2+</sup>がwillardiineに対する感受性を変化させるかどうか調べた(図8. A)。細胞外液として135-Na & Ca液(表3)が用いられ、Ca<sup>2+</sup>濃度だけが0.18 mM、1.8 mMに変えられた。EC<sub>50</sub>とHill 係数は、それぞれ、0.18 mM Ca<sup>2+</sup>では129.0 ± 26.0 μMと1.2 ± 0.2 (n = 6)、1.8 mM Ca<sup>2+</sup>では127.0 ± 26.7 μMと1.2 ± 0.2 (n = 5)であった(図8. B)。Student's t-test 検定法によるEC<sub>50</sub>の値とHill 係数のPの値は、それぞれ、0.95、0.94であり、統計的な差はなかった。つまり、0.18 m ~ 1.8 mM Ca<sup>2+</sup>は、willardiineのEC<sub>50</sub>を変化させなかった。このことはCa<sup>2+</sup>がwillardiineの応答電流を willardiine とは非競合的に抑制し

ていることを示す。

willardiine 応答電流を記録した細胞の43 個中 7 個が(17 %)が応答電流において最低一回は脱感作を持った(図7.B)。しかし, 脱感作の有無に関わらず $\text{Ca}^{2+}$ 抑制効果の機能的違いは無かった。

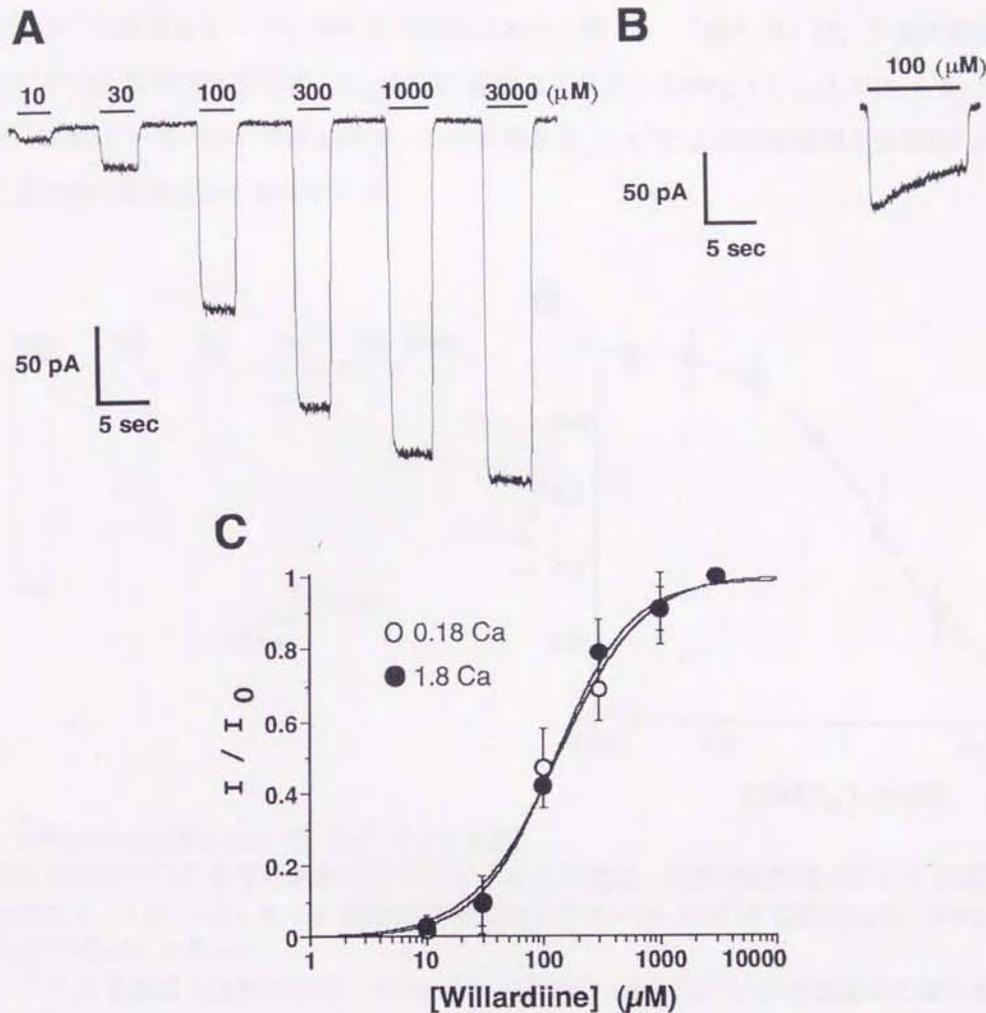


図8 : GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを共発現しているHEK 293 細胞における willardiine濃度と応答の大きさの関係

(A) Normal 細胞外液 (1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )における各willardiine濃度に対するホールセル電流応答. 細胞内電位を-80 mV に固定した.

(B)脱感作を持ったwillardiine 応答電流. 細胞内電位を-80 mV に固定した.

(C) willardiineの濃度-応答電流曲線. それぞれの測定シリーズにおいて, 3,000  $\mu\text{M}$ の応答を基準の1とした. そして, 各々の濃度のwillardiine応答は, この値の比であらわした. それぞれの点は3個の細胞から得た値の平均を示し, エラーバーは標準偏差を示す. willardiineのHillプロットの曲線フィッティングを実行し,  $\text{EC}_{50}$  と Hill係数の値を  $I = 1 / [1 + (\text{EC}_{50} / c)^n]$  の式でのフィッティングにより算出した.  $I$ は最大電流に対して規格化された電流の大きさであり,  $\text{EC}_{50}$ は最大応答の半分を生じさせたときの濃度である.  $c$ はアゴニストの濃度であり,  $n$ はHill係数である.

### 2. 2. 3. willardiine応答電流に対するCa<sup>2+</sup>の抑制

Ca<sup>2+</sup>濃度と抑制の大きさの関係を定めるために、Ca<sup>2+</sup>濃度を変化させつつ、GluR6(Q)/KA-2 サブユニットからなる受容体を共発現させた細胞における100 μM willardiine に対する応答電流を記録した(図9. A). Ca<sup>2+</sup>濃度が増えるにつれてwillardiine 応答電流が抑制された. 135-Na & Ca 細胞外液中のCa<sup>2+</sup>の濃度を0 ~ 54 mM まで変化させた(表 3). (図9. B) は、5 個の細胞から得られた結果の平均と標準偏差を示す. IC<sub>50</sub>とHill 係数は1.9 ± 0.4 μMと1.0 ± 0.3 (n = 5)であった. 通常のCa<sup>2+</sup>濃度は1~5 mM であるので、この結果から、Ca<sup>2+</sup>による抑制効果が生理的Ca<sup>2+</sup>濃度でも十分おこる現象であるという事がいえる.

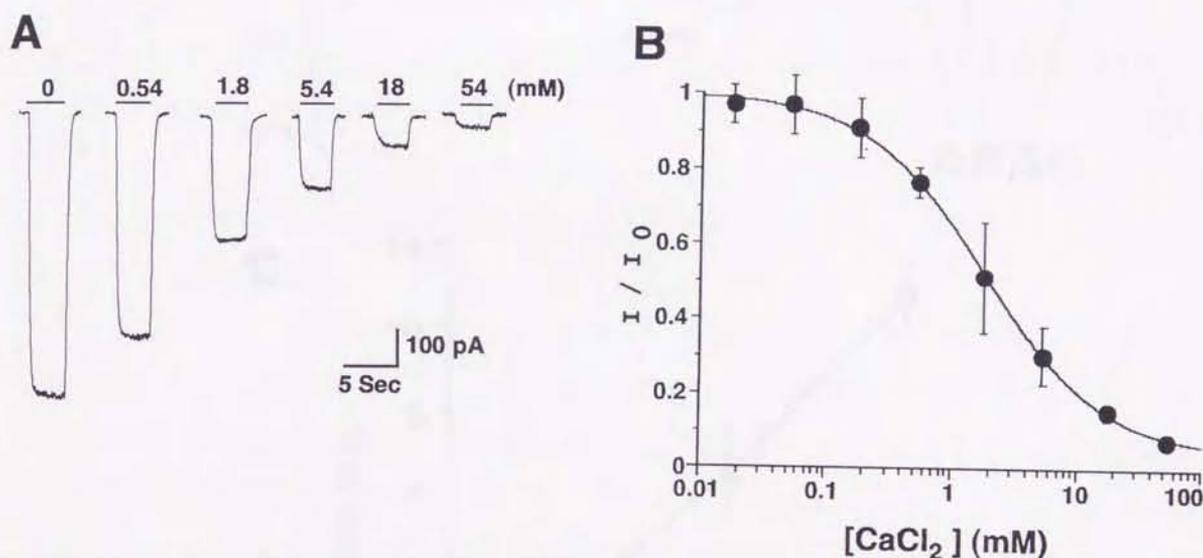


図9 : willardiine応答に対する Ca<sup>2+</sup>による抑制

(A) 異なる濃度のCa<sup>2+</sup>を含む細胞外液中のホールセル電流. 細胞内電位を-80 mV に固定した. Ca<sup>2+</sup>の濃度を、135-NaCl & Ca 細胞外液中において0~54 mM まで変化した. willardiine の濃度は100 μM であった.

(B) Ca<sup>2+</sup>による濃度と抑制の関係. willardiine応答を0 mM Ca<sup>2+</sup>における応答の値を基に規格化し、Ca<sup>2+</sup>の濃度の関数としてプロットした. 各々の点と棒はそれぞれ、平均と標準偏差を示し、式  $I = (I_{\max} - I_{\min}) / [1 + ([Ca^{2+}] / IC_{50})^n]$  の式によってフィッティングされた.  $I_{\max}$  はCa<sup>2+</sup>非存在下での電流の大きさ、 $I_{\min}$  はCa<sup>2+</sup>が54 mM の場合の電流の大きさ、 $IC_{50}$  は最大抑制の半分のときのCa<sup>2+</sup>濃度である.

### 2. 2. 4. 反転電位とNaCl濃度との関係

GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットをHEK 293 細胞に共発現させた場合、Con A 付加後のドーモイ酸応答におけるCa<sup>2+</sup>透過性が報告されている(Kambojら 1995). willardiine に対する応答電流におけるCa<sup>2+</sup>の透過性はどうか? 受容体と発現させている細胞も同一であるから、透過する可能性がある. しかし、もしCa<sup>2+</sup>が透過しなければ、受容体と同じでも、アゴニストの種類によってイオン透過性が変化する可能性が出てくる.

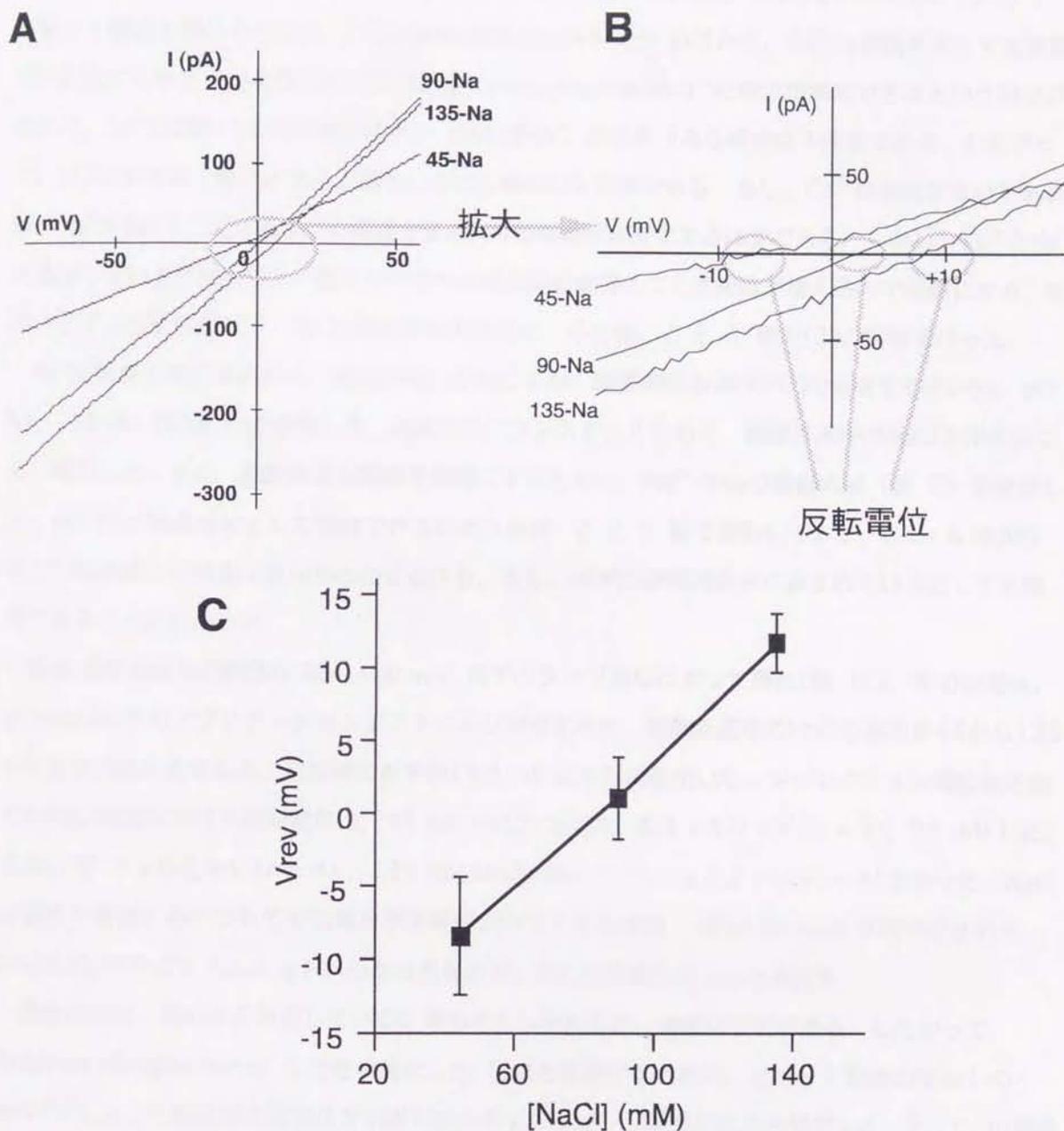


図10：細胞外液中のNaClの濃度を45～135 mMに変化させた場合の電流-電圧の関係と反転電位との関係

浸透圧を補償するために、NaClをN-methyl-D-glucamine (NMDG)によって置換した(表2)。willardiineの濃度は100 μMであった。電流-電圧曲線を2秒間の-80から60 mVまで変化するランプ電圧波形によって得た。波形をpClamp6中のアプリケーションプログラムによって制御した。

(A) 電流-電圧とNaClの濃度間の関係。電流-電圧曲線を-80から60 mVまでの定常状態の応答から得た。反転電位は、それぞれ、45 mMでは-4.1 mV、90 mMでは2.6 mV、135 mMでは+8.2 mVであった。

(B) (A)の図の反転電位付近の拡大図

(C) 各NaCl濃度における反転電位

$\text{Ca}^{2+}$ が透過しているかどうかを調べるためには、(1) $\text{Ca}^{2+}$ だけの液（例えば110-Ca液（表3））を使って電流を調べる方法と、(2)Goldman-Hodgkin-Katzs の式から、 $\text{Ca}^{2+}$ の濃度を変えて反転電位が変化するかどうかを調べる方法がある。(1)の方法は直接 $\text{Ca}^{2+}$ の電流が測定できるという利点があるが、 $\text{Ca}^{2+}$ が流れるために他のイオン（例えば $\text{Na}^+$ ）が必要である場合は不向きである。したがって、(2)の方法は、他のイオンと混在している場合にも有効である。もし、 $\text{Ca}^{2+}$ が透過するのであれば、 $\text{Na}^+$ が混在していても $\text{Ca}^{2+}$ の濃度を変えれば反転電位が変化するはずである。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Na}^+$ が混在している状態から、一度にそれぞれの透過係数を求めることは変数が増えるので困難になる。従って、まずこの節において、 $\text{Na}^+$ の透過係数を求めた。その後、2.2.6.節で(2)の実験を行った。

$\text{Na}^+$ に焦点を当てるために、細胞外液には $\text{NaCl}$ とpH調整剤であるHEPESのみを含む45-Na, 90-Na, 135-Na液(表3)を使用した。浸透圧のバランスをとるために、細胞外液中の $\text{NaCl}$ をNMDGにより補完した。また、細胞内液も組成を単純にするために、 $\text{Mg}^{2+}$ -freeの電極内液(表5)を使用した。HEPESが電流成分として無視できるかどうかは、2.2.5.節で検討しており、0-Ca & NMDG液では電流成分が検出できなかったことから、もし、HEPESが電流成分に含まれているとしても無視できることがわかった。

電流-電圧曲線を2秒間の-80~+60 mVまでのランプ波形によって得た(図10)。その波形は、pClamp6の中のアプリケーションソフトにより制御された。細胞外液中の $\text{NaCl}$ の濃度を45から135 mMまでの変化させると、反転電位が平均19.9 mV正方向に変化した。ジャンクション電位補正後の各 $\text{NaCl}$ 濃度における反転電位は、45 mM  $\text{NaCl}$ において  $-8.4 \pm 4.0$  mV ( $n = 3$ )、90 mM  $\text{NaCl}$ において  $1.6 \pm 0.2$  mV ( $n = 4$ )、135 mM  $\text{NaCl}$ において  $11.7 \pm 2.0$  mV ( $n = 4$ )であった。 $\text{NaCl}$ の濃度が増加するにつれて反転電位が正極側にシフトする事は、willardiineにより活性化されたGluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体が、 $\text{Na}^+$ の透過を持つことを示す。

細胞内には、初めから存在している $\text{K}^+$ 等のイオンがあるが、濃度は不明である。したがってGoldman-Hodgkin-Katzs の式を単純化した(1)式を使用するために、ピペット電極の中の140 mM  $\text{Cs}^+$ によって細胞内の受容体を透過可能な全てのイオンが置換されたと仮定した。 $P_{\text{Na}}/P_{\text{Cs}}$ の透過係数比を、細胞外液の $\text{Na}^+$ の濃度、細胞内液の $\text{Cs}^+$ の濃度、反転電位を(1)式に代入し算出した。各 $\text{NaCl}$ 濃度における $\text{Cs}^+$ に対する $\text{Na}^+$ の透過係数比は、それぞれ、45 mM  $\text{NaCl}$ では  $2.3 \pm 0.4$  ( $n = 3$ )、90 mM  $\text{NaCl}$ では  $1.6 \pm 0.2$  ( $n = 4$ )、135 mM  $\text{NaCl}$ では  $2.3 \pm 0.4$  ( $n = 3$ )であった。

## 2. 2. 5. Na-free 細胞外液におけるwillardiineに対する無応答

$\text{Ca}^{2+}$ が受容体を透過するかどうかを調べるために、Na-free 細胞外液中の $\text{CaCl}_2$ の濃度を 0 mM (0-Ca), 1.8 mM (1.8-Ca), 18 mM (18-Ca) 110 mM (110-Ca) (表3)に変化させた。浸透圧のバランス調整のために、細胞外液中の $\text{NaCl}$ をNMDGで補完した。しかし、これらのNa-free細胞

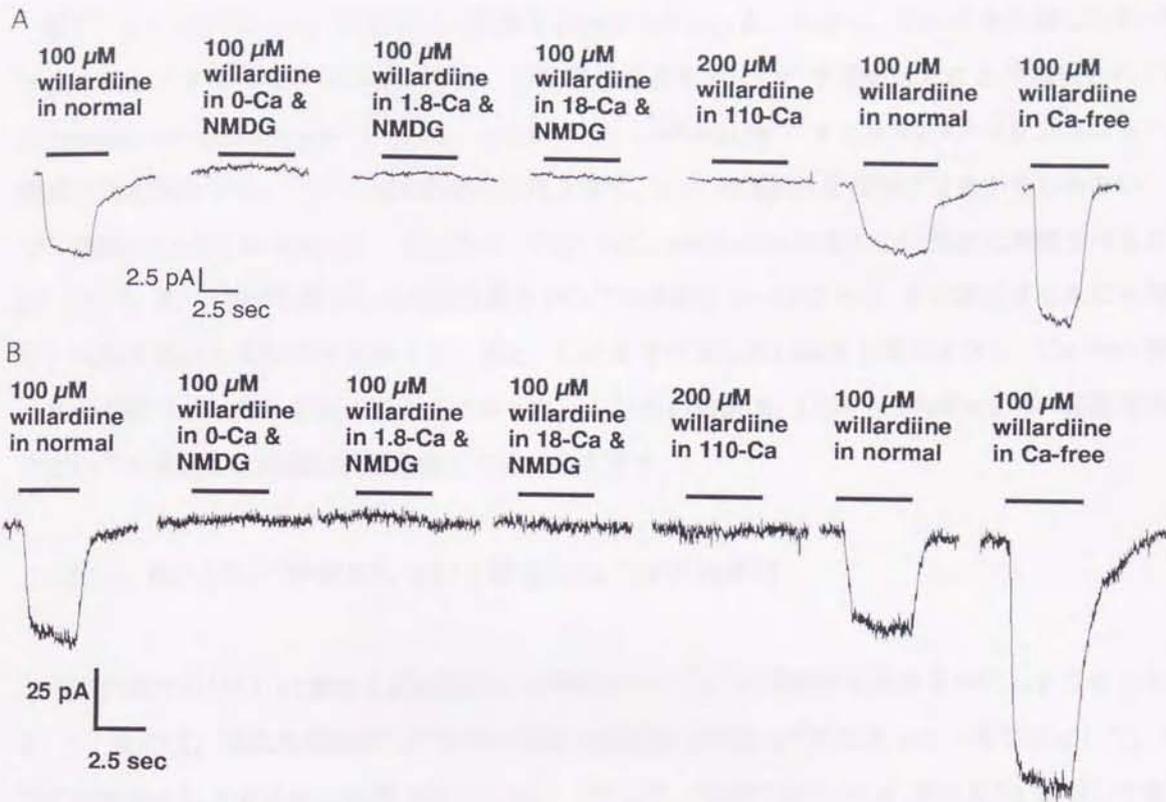


図 11 :  $\text{Na}^+$ -free 細胞外液における willardiine に対する無応答

(A)  $\text{Ca}^{2+}$  は, willardiine により活性化された GluR6(Q)/KA-2 サブユニットからなる受容体を透過しなかった. 各濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を含む細胞外液において, ホールセル電流を測定した. 細胞内電位を  $-80 \text{ mV}$  に固定した. 細胞外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を  $0 \sim 110 \text{ mM}$  まで変化させた. willardiine の濃度は  $100 \mu\text{M}$  であった.

(B) Con A は, willardiine により活性化された GluR6(Q)/KA-2 サブユニット受容体の透過性に影響しなかった. Con A を付加した後, 各濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  を含む細胞外液において, ホールセル電流を測定した. 細胞内電位を  $-80 \text{ mV}$  に固定した. 細胞外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度を  $0 \sim 110 \text{ mM}$  まで変化させた. willardiine の濃度は  $100 \mu\text{M}$  であった.

外液において, 内向き電流を検出できなかった (図 11. A).  $\text{Na}^+$ -free 0-Ca/NMDG 細胞外溶液において, 電流を検出できなかったため, willardiine によって活性化された GluR6(Q)/KA-2 受容体における NMDG と HEPES に対する透過性は無視できる. 1.8-Ca 細胞外液において, わずかな外向き電流のみ検出した. 18-Ca 細胞外液において, 内向き電流を検出できなかったが, NMDG が  $\text{Ca}^{2+}$  の透過を阻害している可能性があった. そこで, NMDG を含まない 110-Ca 細胞外溶液における  $100 \mu\text{M}$  willardiine の投与に対する電流応答を測定したが, 内向き電流を示さなかった. つまり,  $\text{Ca}^{2+}$  の流入は NMDG の有無に関わらず検出できなかった. 以上の結果から,  $\text{Ca}^{2+}$  は willardiine 応答内向き電流中のごくわずかな要素であることが示唆された. そのため,  $\text{Na}^+$ -free 細胞外液において電流が小さすぎるので,  $\text{Cs}^+$  に対する  $\text{Ca}^{2+}$  の透過係数比を得るための反転電位を記録できなかった.

図11. Aにおいて、 $\text{Ca}^{2+}$ の電流成分要素を検出できなかった。しかし、Con Aを付加した単一種のサブユニットからなるGluR6受容体は、反転電位を変えずに $\text{Ca}^{2+}$ を透過したことが報告されている (Egebjerg と Heinemann 1993)。したがって、GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを共発現させた場合でも、Con Aは反転電位を変えずに、 $\text{Ca}^{2+}$ の透過性を増加させるかもしれない。そこで、細胞にCon Aを付加した。ところが、Con Aは、willardiine応答の $\text{Ca}^{2+}$ 効果に影響を与えなかった (図11. B)。 $\text{Na}^+$ を除去した細胞外液中の $\text{Ca}^{2+}$ の濃度を0~110 mM まで変化させたにも関わらず、内向き電流を検出できなかった。また、Con Aを付加しない場合と同じように、Ca-free細胞外液中の応答はノーマルの液よりも大きかった。これらの結果は、Con Aがwillardiine 応答電流に対する $\text{Ca}^{2+}$ の透過性と抑制効果に影響しないことを示す。

## 2. 2. 6. $\text{Na}^+$ と $\text{Ca}^{2+}$ が混在している場合の $\text{Ca}^{2+}$ の非透過性

細胞外液中の $\text{CaCl}_2$ の濃度と反転電位との関係から、 $\text{Ca}^{2+}$ の透過性をあきらかにしようとした。2. 2. 5. 節では、細胞外溶液が $\text{Ca}^{2+}$ のみの場合は電流成分を検出できなかった。可能性として、 $\text{Na}^+$ は $\text{Ca}^{2+}$ 電流を生じさせるのに必要かもしれない。そこで、電流における $\text{Ca}^{2+}$ 成分を $\text{Na}^+$ に対して相対的に増大させ、反転電位の変化を大きくするために、細胞外液のNaClの濃度を90 mM に減らし、45 mM NMDGによって補完した。そして、 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を0.18, 1.8, 5.4, 18 mM に変化させて、電流-電圧曲線を2秒間の-80 ~+60 mVの電圧ランプ波形により得た。細胞内のポリアミンによると思われる整流特性を持った電流-電圧曲線も得られた(35%) (図12. A)。ジャンクション電位の補正後の反転電位は、0.18 mMでは $-0.6 \pm 6.4$  mV ( $n = 10$ )、1.8 mMでは $-1.8 \pm 3.6$  mV ( $n = 13$ )、5.4 mMでは $-0.9 \pm 3.6$  mV ( $n = 11$ )、1.8 mMでは $-1.3 \pm 5.0$  mV ( $n = 11$ )であった (図12. C)。 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が、0.18, 1.8, 5.4, 18 mM における反転電位間の統計検定 (Wilcoxon matched paired signed-rank test) を行った。Pの値はそれぞれ、0.18 と1.8 mM の間で0.59, 0.18 と5.4 mM の間で0.44, 0.18 と18 mM の間で0.92 であり、この結果は各 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の反転電位間には統計的に大きな違いがないことを示す。もし、 $\text{Ca}^{2+}$ が受容のチャネルを透過するのであれば、Goldman-Hodgkin-Katzの式からわかるように反転電位は正極側に変化するはずであった。しかし、正極側への変化は起きなかった。このことは、 $\text{Ca}^{2+}$ がwillardiineが活性化させた受容体チャネルをほとんど透過しなかったことを示唆する。

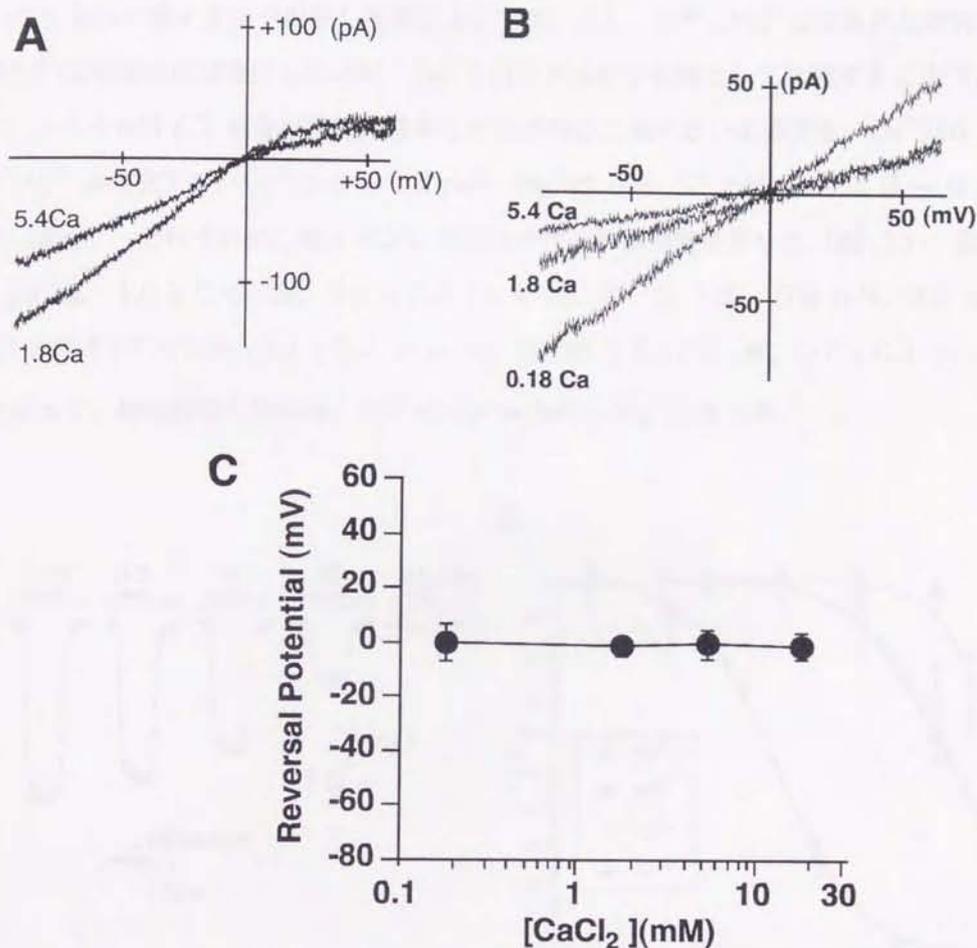


図12 :  $\text{Ca}^{2+}$  と  $\text{Na}^{+}$  との混合液中の反転電位の関係

(A) 整流特性を持つ電流-電圧と  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度との関係

電流-電圧と  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度との関係を調べるために、90 mM NaCl と 45 mM NMDG と 5 mM HEPES を含む細胞外液において、 $\text{CaCl}_2$  の濃度を 1.8 ~ 5.4 mM まで変化させた。電流-電圧曲線を 2 秒間の -80 から 60 mV までの電圧ランプ波形により得た。willardiine の濃度は 100  $\mu$ M であった。

(B) 電流-電圧と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度との関係

電流-電圧と  $\text{Ca}^{2+}$  濃度との関係を調べるために、90 mM NaCl と 45 mM NMDG と 5 mM HEPES を含む細胞外液において、 $\text{CaCl}_2$  濃度を 0.18 ~ 5.4 mM まで変化させた。電流-電圧曲線を 2 秒間の -80 から 60 mV までの電圧ランプ波形により得た。willardiine の濃度は 100  $\mu$ M であった。反転電位は、それぞれ、0.18 mM では -4.4 mV、1.8 mM では -6.9 mV、5.4 mM では -5.2 mV であった。

(C) 各  $\text{CaCl}_2$  濃度における反転電位

ジャンクション電位の補正後の反転電位は、0.18 mM では  $-0.6 \pm 6.4$  mV ( $n = 10$ )、1.8 mM では  $-1.8 \pm 3.6$  mV ( $n = 13$ )、5.4 mM では  $-0.9 \pm 3.6$  mV ( $n = 11$ )、1.8 mM では  $-1.3 \pm 5.0$  mV ( $n = 11$ ) であった。

## 2. 2. 7. 二価イオンによる抑制効果

Ca<sup>2+</sup>以外の二価イオンとしてZn<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>の100 μM willardiine 応答電流に対する効果を測定した。これらの二価イオンを選択した理由としては、(1) Zn<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>は生体内に存在していること、(2) Ba<sup>2+</sup>は生体内には存在しないが、Ca<sup>2+</sup>と同じアルカリ金属として比較することである。135 mM NaCl と 5.4 mM KCl を含む細胞外液中のそれぞれの二価イオンの濃度を、Ca<sup>2+</sup>は0 ~ 30 mM (1 mM Mg<sup>2+</sup> 非存在下), Ba<sup>2+</sup>は0 ~ 30 mM, Mg<sup>2+</sup>は0 ~ 30 mM, Zn<sup>2+</sup>は0 ~ 0.3 mM に変化させた(表4)。それぞれの二価イオンは濃度依存性の抑制効果を示した(図13)。各IC<sub>50</sub>とHill係数は、Ca<sup>2+</sup>は、1.6 ± 0.4 mM, 0.9 ± 0.2 (n = 8), Ba<sup>2+</sup>は 1.8 ± 0.8 mM, 0.6 ± 0.1 (n = 4), Mg<sup>2+</sup>は 9.4 ± 5.4 mM, 9.4 ± 0.2 (n = 5), Zn<sup>2+</sup>は 6.8 ± 2.5 μM, 0.7 ± 0.1 (n = 8)であった。したがって、抑制効果の強弱は、Zn<sup>2+</sup> >> Ca<sup>2+</sup> = Ba<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup>となった。

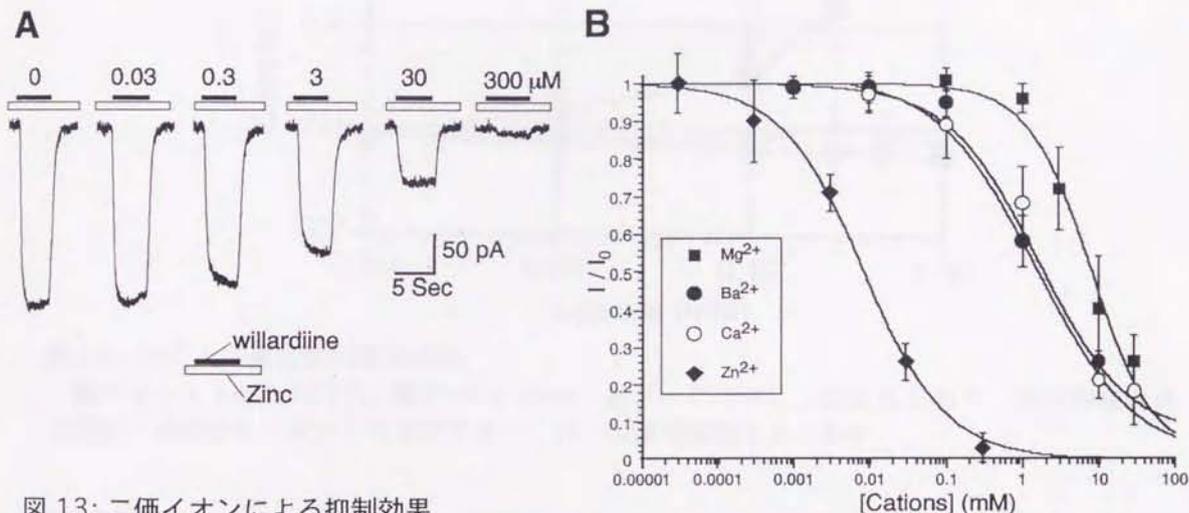


図 13: 二価イオンによる抑制効果

(A) Zn<sup>2+</sup>による100 μM willardiine 応答電流の抑制。細胞内電位を-80 mV に固定した。

(B) 二価イオンによる100 μM willardiine 応答電流の抑制。willardiine応答を二価イオン非存在下における応答の値を基に規格化し、Ca<sup>2+</sup>濃度の関数としてプロットした。各々の点は平均と標準偏差を示し、式  $I = (I_{max} - I_{min}) / [1 + ([Ca^{2+}] / IC_{50})^n]$  の式によってフィッティングされた。I<sub>max</sub> は二価イオン非存在下での電流の大きさ、I<sub>min</sub> は最小電流の大きさ、IC<sub>50</sub> は最大抑制の半分のときのCa<sup>2+</sup>の濃度である。

## 2. 2. 8. Ca<sup>2+</sup>とwillardiineとの複合体

Ca<sup>2+</sup>とwillardiine とが複合体を形成するかどうかを確かめるために、Ca<sup>2+</sup>感受性イオン電極を使用して、遊離Ca<sup>2+</sup>の濃度を測定した。対照実験として、EDTAとの滴定測定を行った。10-EDTAと9 ml の1-Ca 細胞外液の混合した結果、9割程度の遊離Ca<sup>2+</sup>の減少を検出した。このことはEDTAとCa<sup>2+</sup>の複合体が0.79 ± 0.01 mM (n = 3) 生成された事をあらわし、また、実験系が正常であることも示した。10-willardiine 1 ml と 1-Ca 細胞外液 9 ml を混合した結果、-0.05 ± 0.11 mM

( $n = 3$ ) の複合体が生成された. 10-L-glutamateと 9 ml の1-Ca 細胞外液の混合した結果,  $-0.03 \pm 0.07$  mM ( $n = 3$ ) の複合体が生成された. 値が負を示す理由は, まず, (1) 感度が低いこと(2)測定器における値はデジタル表示なので, 値が量子化されてしまうことである. つまり, 未表示部分の桁内の変化が検出されないということである.

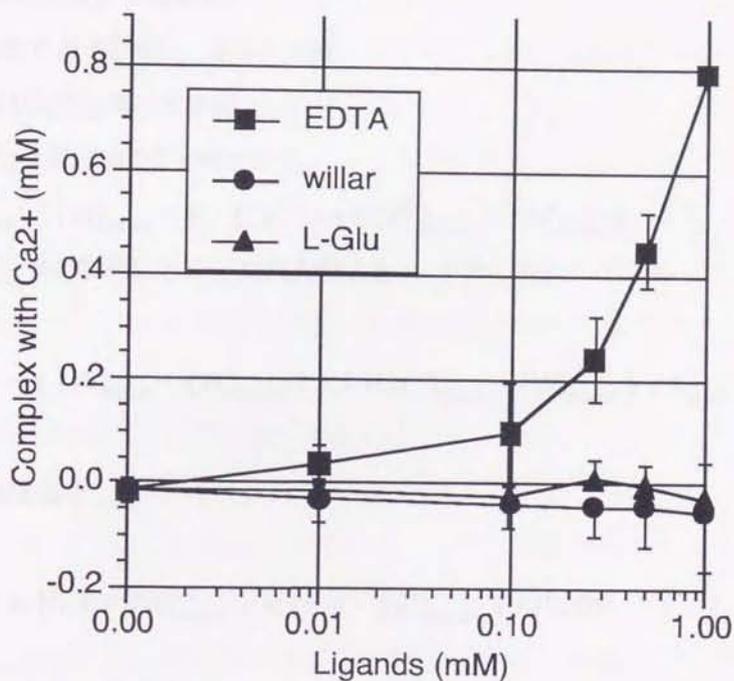


図 14 :  $\text{Ca}^{2+}$  との複合体の滴定曲線

■がキレート剤のEDTA, ●がwillardiine, ▲がL-グルタミン酸をあらわす. 縦軸が複合体の濃度, 横軸が各リガンドの濃度である. バーは標準偏差をあらわす.

複合体形成のために一つの $\text{Ca}^{2+}$ が一つのwillardiineを必要とすると仮定する. この減少された遊離 $\text{Ca}^{2+}$ がwillardiineとの複合体を作成したと仮定する. 最悪の場合の解離定数を算出する.

遊離しているwillardiine濃度である $[\text{W}]_{\text{free}}$  は, 0.95 mM

$\text{Ca}^{2+}$  と willardiine の複合体の濃度である $[\text{W}]_{\text{bound}}$  は, 0.05 mM

遊離している $\text{Ca}^{2+}$ 濃度である $[\text{Ca}^{2+}]_0$  は, 0.95 mM

解離定数は $K_{\text{diss}}$

$[\text{W}]_{\text{bound}} = [\text{W}]_{\text{free}} \times [\text{Ca}^{2+}]_0 / K_{\text{diss}}$  を変形すると

$$K_{\text{diss}} = [\text{W}]_{\text{free}} \times [\text{Ca}^{2+}]_0 / [\text{W}]_{\text{bound}}$$

それぞれの項に条件を入れると,

$$K_{\text{diss}} = 0.95 \times 0.95 / 0.05 = 18.05 \text{ mM}$$

以上のように解離定数が得られた。

次に、2.2.3.節と比較するために、

全willardiine濃度である $[W]_{\text{free}}$ を0.1 mM

全 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度である $[\text{Ca}^{2+}]_0$ を1.8 mM

解離定数である $K_{\text{diss}}$ を18.05 mMとする。

$[W]_{\text{free}} = [W]_{\text{total}} - [W]_{\text{bound}}$  と  $[\text{Ca}^{2+}]_0 = [\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} - [W]_{\text{bound}}$ を

$[W]_{\text{bound}} = [W]_{\text{free}} \times [\text{Ca}^{2+}]_0 / K_{\text{diss}}$ に代入すると

$$[W]_{\text{bound}} = ([W]_{\text{total}} - [W]_{\text{bound}}) \times ([\text{Ca}^{2+}]_{\text{total}} - [W]_{\text{bound}}) / K_{\text{diss}}$$

各項に条件を代入すると

$$[W]_{\text{bound}} = (0.1 - [W]_{\text{bound}}) \times (1.8 - [W]_{\text{bound}}) / 18.05$$

式を変形すると

$$18.05 \times [W]_{\text{bound}} = (0.1 - [W]_{\text{bound}}) \times (1.8 - [W]_{\text{bound}})$$

$$([W]_{\text{bound}})^2 - 19.95 \times [W]_{\text{bound}} + 1.8 = 0$$

となり、 $[W]_{\text{bound}}$ は、2次方程式の解になる。

$[W]_{\text{bound}} = 0.009 \text{ mM}$  であり

$[W]_{\text{free}} = 0.1 - 0.009 = 0.091 \text{ mM} = 91 \mu\text{M}$  となる。

つまり、最悪の場合、1.8 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下での遊離willardiine 濃度は、91  $\mu\text{M}$  と想定できる。  
図8 Cによると、100  $\mu\text{M}$ と91  $\mu\text{M}$ の応答電流の大きさの差はほとんど無い。したがって、最悪の場合でも $\text{Ca}^{2+}$ と willardiine との複合体による見かけの抑制効果は十分無視できる。

## 2. 3. 考察

### 2. 3. 1. 神経細胞におけるwillardiineの効果

GluR6サブユニットと KA-2サブユニットとが、ラット海馬に発現していることも報告されている (Egebjergら, 1991, Herbら, 1992). 培養されたラット海馬神経における $EC_{50}$  と Hill係数は, それぞれ,  $173 \mu\text{M}$  と  $1.16$ であり,  $3 \text{ mM CaCl}_2$ を含む細胞外液の記録から算出された (Zorumskiら, 1991). 一方, 培養されたマウス海馬神経において,  $2 \text{ mM CaCl}_2$ を含む細胞外液の記録から算出された $EC_{50}$  と Hill係数は, それぞれ,  $44.8 \pm 15.0 \mu\text{M}$  と  $1.32 \pm 0.12$ であった (Patneauら, 1992). 我々の値はラットの値に近い. おそらく受容体がラット由来であることがその理由と考えられる. また, 培養細胞に再構築されたGluR6(Q)/KA-2受容体と海馬神経との間の値の違いは, 海馬神経細胞におけるサブユニット構成の異なるカイニン酸受容体の存在を示唆する.

### 2. 3. 2. willardiine応答電流における脱感作

マウス胎児の海馬神経における AMPA/カイニン酸受容体の(S)-willardiine 応答電流は, 素早い脱感作を持つが脱感作は完全ではない (Patneau ら 1992). GluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットとを共発現しているHEK 293 細胞において, willardiine の類似体である(S)-5-Iodowillardiine (IW)が, 遅い脱感作を持った電流応答を生じさせたことが, 報告されている (Swansonら 1998). 本稿では, willardiine 応答電流を記録した細胞の17 %が最低一回は脱感作を持った (図7.B). 脱感作の原因は不明だが, おそらく細胞内の条件に依存すると思われる.

### 2. 3. 3. Con Aによる効果

Con A による応答電流の脱感作の抑制と最大電流の増強が報告されている (Partinら 1993). しかし, 2. 3. 5. 節において Con A の効果は検出できなかった. 具体的には,  $1.8 \text{ mM Ca}^{2+}$  (Normal 細胞外溶液) による抑制効果もあり,  $110\text{-Ca}$  細胞外溶液 (表 3) における内向き電流も検出できなかった. この結果は, Con A がwillardiine 応答電流における $\text{Ca}^{2+}$ 透過性を変化させなかったことを示唆する.

### 2. 3. 4. ポリアミンによる整流特性と $\text{Ca}^{2+}$ による抑制効果の関係

再構築されたGluR6(Q)/KA-2 受容体の応答電流に対する, ポリアミンによる整流特性が報告されている (Kambojら 1995). しかし, 2. 3. 4 節及び, 2. 3. 6. 節では, いくつかの細胞は整流特性を持たなかった. おそらく, これは細胞内のポリアミン濃度を反映した結果である. また, 整流特性を持った電流-電圧特性曲線 (図 12 A) において, 内向き電流が $\text{Ca}^{2+}$ により抑制されている.

されている。このことは細胞内のポリアミンの有無に関わらず $\text{Ca}^{2+}$ による調節がおきることを示す。

### 2. 3. 5. イオン透過性

本稿において、willardiine によって活性化されたGluR6(Q)/KA-2 受容体が $\text{Na}^+$ を透過したが、 $\text{Ca}^{2+}$ をほとんど透過しないことを示した。しかし、GluR6(Q) 及び GluR6(R)サブユニットの単独発現の場合とGluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットとの共発現の場合における $\text{Ca}^{2+}$ 透過性がすでに報告されている。単独発現の場合、GluR6サブユニットの(Q)型と(R)型の両方が $\text{Ca}^{2+}$ に対して透過性を持つ(Egebjerg と Heinemann 1993)。共発現させたHEK 293 培養細胞において $\text{Ca}^{2+}$ の透過性が観察されている (Kamboj ら1995)。 $\text{Ca}^{2+}$ 透過性の変化の原因はおそらくアゴニストの種類と思われる。上記の論文で使われていたアゴニストは、カイニン酸とドーモイ酸である。これらのアゴニストはGluR6サブユニットを活性化させ、KA-2サブユニットを必ずしも必要としない。本稿で使用したwillardiineは、活性化のためにKA-2サブユニットを必要とした。これらの事から類推すると、 $\text{Ca}^{2+}$ が透過するためにはGluR6サブユニットを活性化する必要があるかもしれない。また、KA-2サブユニットを選択的に活性化させると $\text{Na}^+$ 等のイオンを通すが、 $\text{Ca}^{2+}$ を通さない可能性も考えられる。

### 2. 3. 6. 二価イオンによる電流調節

GluR6サブユニットからなる受容体を発現している卵母細胞において、 $\text{Ca}^{2+}$ は、細胞外液中の濃度が2 mM 以下では応答電流を抑制し、2 mM 以上では増強させる (Egebjerg と Heinemann, 1993)。しかし、本稿で再構築されたGluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体のwillardiine 応答電流は、増強効果を示さず、細胞外液中の $\text{Ca}^{2+}$ が上昇するにつれて抑制された。これらの結果の違いは、受容体における $\text{Ca}^{2+}$ の電流調節効果が、アゴニストとサブユニットの組み合わせにより変化することを示す。

2.2.7.節における $\text{Ca}^{2+}$ 以外の二価イオンによる効果について考察する。 $\text{Zn}^{2+}$ は神経系において疾病や細胞死に関する重要な役割をもつイオンであり、NMDA受容体やAMPA受容体に対する効果が数多く報告されている。生体中に放出される $\text{Zn}^{2+}$ 濃度は $\sim 100 \mu\text{M}$ 程度である (Assafら 1984)。本稿における $\text{Zn}^{2+}$ の $\text{IC}_{50}$ は、 $6.8 \pm 2.5 \mu\text{M}$ である。つまり、この濃度は十分に生理学的な濃度であり、生体中における効果の可能性を示唆する。2.2.3.節における、1 mM  $\text{Mg}^{2+}$ 存在下で測定した $\text{Ca}^{2+}$ の $\text{IC}_{50}$ は、 $1.9 \pm 0.4 \text{ mM}$ であり、2.2.7.節における、 $\text{Mg}^{2+}$ 非存在下で測定した $\text{Ca}^{2+}$ の $\text{IC}_{50}$ は、 $1.6 \pm 0.4 \text{ mM}$ であったので、大きな違いはなかった。また、 $\text{Mg}^{2+}$ の $\text{IC}_{50}$ は、 $9.4 \pm 5.4 \text{ mM}$ であり、生理的濃度とはいえないので、生体内中のGluR6(Q)/KA-2 受容体に対する $\text{Mg}^{2+}$ の影響は少ないと予想できる。2.2.7.節の $\text{Ba}^{2+}$ の $\text{IC}_{50}$ は、 $1.8 \pm 0.8 \text{ mM}$ であり、 $\text{Ca}^{2+}$ との大きな違いは見られなかった。

### 2. 3. 7. $\text{Ca}^{2+}$ 効果の機構仮説

本稿において $\text{Ca}^{2+}$ による抑制効果と非透過性が示されたが、どのような機構によるものであろうか？  
二つの仮説をたてて考察してみる。

- (1)  $\text{Ca}^{2+}$ が結合する特別な部位が受容体に存在する。
- (2) 受容体のチャンネル部位を $\text{Ca}^{2+}$ が閉鎖する。

- (1)  $\text{Ca}^{2+}$ が結合する特別な部位が受容体に存在する。

$\text{Ca}^{2+}$ 抑制効果の機構は、 $\text{Ca}^{2+}$ がチャンネル領域よりもむしろ、それ以外の特別な部位への結合による構造変化がおこしたのではないかと仮定してみる。電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルでの $\text{Ca}^{2+}$ による閉鎖機構で報告されているような $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位 (Hessら 1986) が、GluR6(Q)/KA-2受容体に存在するかもしれない。また、神経細胞及び培養細胞に再構築されたカイニン酸受容体がlanthnumとgadliumに感受性を持つことが報告されている(Huettnerら 1998)。この報告における機構が本稿の $\text{Ca}^{2+}$ による抑制効果の機構と同様であるかどうかはわからないが、lanthanidesはアゴニスト結合部位とは競合しない(Huettnerら 1998)。また、NMDA受容体もlanthanidesに感受性を持ち(ReichlingとMacdermott 1991)、二価イオンについても同様である(MayerとWestbrook 1987)。他のグルタミン酸受容体の知見からGluR6(Q)/KA-2受容体が $\text{Ca}^{2+}$ 結合部位を持っている可能性が類推できそうである。

- (2) 受容体のチャンネル部位を $\text{Ca}^{2+}$ が閉鎖する。

ラット脊髄三叉神経細胞のカイニン酸応答電流における $\text{Ca}^{2+}$ の透過性と抑制効果が報告されており、その中に $\text{Ca}^{2+}$ による現象の機構仮説が提示されている(GuとHuang 1991)。彼らの仮説によると、カイニン酸により活性化されたチャンネルは、一個のイオン分の穴である。それは、つまり、単一のイオンしかチャンネルに透過することが許されていないという事である。具体的には、あるイオン( $\text{Ca}^{2+}$ 等)がチャンネル中に存在する場合、他のイオン( $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ )がチャンネルを通ることが許されない。もし、GluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体チャンネルの機構が上記の仮説と同様であるならば、イオンが通る穴は彼らの仮説よりも $\text{Ca}^{2+}$ イオンに対して高い抵抗を持っているので透過しないのかもしれない。それ故に、 $\text{Ca}^{2+}$ はGluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体チャンネルを塞ぎ、willardiine 応答の $\text{Na}^+$ 電流を抑制すると考えられる。

では、 $\text{Ca}^{2+}$ に対して高い抵抗を持つのは何故か？一つの可能性として、チャンネルを通るときの脱水機構がある。イオンの種類により水和した場合の大きさや強さが異なるので、チャンネルを通るには脱水機構に適合した大きさが必要である。willardiineによって開口したチャンネルの脱水機構の大きさと水和した $\text{Ca}^{2+}$ の大きさが、 $\text{Na}^+$ に比べて適合しないため、つまり、水和による体積増大のためにチャ

ネルを透過しなかった可能性がある。

2. 2. 1. 節におけるwillardiine応答におけるKA-2サブユニットの必要性, 2. 2. 3. 節における $\text{Ca}^{2+}$ の抑制効果, 2. 2. 5. と2. 2. 6. 節における $\text{Ca}^{2+}$ の非透過性, さらに, 既に報告されている結果を考慮すると, イオンフィルターの性質が, アゴニストの種類と受容体サブユニットの種類両方に依存することが考えられる. 図15にアゴニストと透過性の関係のモデルを示す.

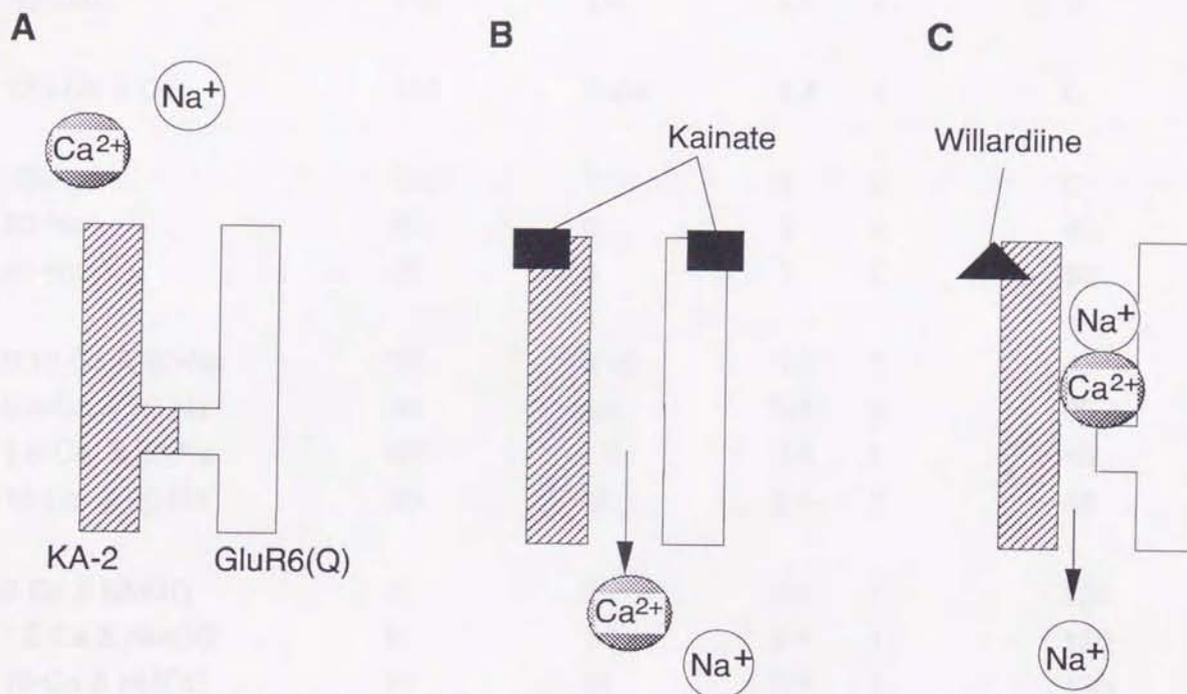


図15: アゴニストと透過性の関係のモデル

(A) アゴニストが結合していないので, イオンが透過しない. (B) カイニン酸はGluR6(Q)サブユニットとKA-2サブユニットを同時に活性化させて,  $\text{Ca}^{2+}$ も通す. (C) willardiineはKA-2サブユニットのみを活性化させるので,  $\text{Ca}^{2+}$ を通さない.

#### 2. 4. カイニン酸受容体におけるwillardiine応答のまとめ

本研究において, GluR6(Q)/KA-2サブユニットからなる受容体をHEK 293 細胞に発現した. そして, 受容体のwillardiine応答電流への $\text{Ca}^{2+}$ 効果をパッチクランプ法により調べた. その結果から下記の事をあきらかにした.

1. willardiineに反応するためにはGluR6(Q)とKA-2サブユニットの共発現が必要であった.
2. 細胞外 $\text{Ca}^{2+}$ はGluR6(Q)/KA-2受容体のwillardiine応答電流を濃度依存的に抑制した.
3. willardiine応答電流において, ほとんど $\text{Ca}^{2+}$ は透過しなかった.

表 3 細胞外液の組成 (1)

|                 | NaCl | CaCl <sub>2</sub> | KCl | MgCl <sub>2</sub> | NMDG |
|-----------------|------|-------------------|-----|-------------------|------|
| Normal          | 135  | 1.8               | 5.4 | 1                 | 0    |
| 135-Na & Ca     | 135  | 0~54              | 5.4 | 1                 | 0    |
| 135-Na          | 135  | 0                 | 0   | 0                 | 0    |
| 90-Na           | 90   | 0                 | 0   | 0                 | 45   |
| 45-Na           | 45   | 0                 | 0   | 0                 | 90   |
| 0.18-Ca & 90-Na | 90   | 0.18              | 5.4 | 1                 | 45   |
| 5.4-Ca & 90-Na  | 90   | 5.4               | 5.4 | 1                 | 45   |
| 1.8-Ca & 90-Na  | 90   | 1.8               | 5.4 | 1                 | 45   |
| 18-Ca & 90-Na   | 90   | 18                | 5.4 | 1                 | 45   |
| 0-Ca & NMDG     | 0    | 0                 | 5.4 | 1                 | 135  |
| 1.8-Ca & NMDG   | 0    | 1.8               | 5.4 | 1                 | 135  |
| 18-Ca & NMDG    | 0    | 18                | 5.4 | 1                 | 135  |
| 110-Ca          | 0    | 110               | 0   | 0                 | 0    |
| Ca-free         | 135  | 0                 | 5.4 | 1                 | 0    |
| 1-Ca            | 135  | 1                 | 5.4 | 1                 | 0    |

値の単位は mM. 全ての液は 5 mM HEPESを含み, HCl, NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub>によってpHが7.2に調整された.

表 4 細胞外液の組成 (2)<sup>1)</sup>

|             | NaCl | KCl | CaCl <sub>2</sub> | MgCl <sub>2</sub> | BaCl <sub>2</sub> | ZnCl <sub>2</sub> |
|-------------|------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 135-Na/x-Ca | 135  | 5.4 | 0~30              | 0                 | 0                 | 0                 |
| 135-Na/x-Mg | 135  | 5.4 | 0                 | 0~30              | 0                 | 0                 |
| 135-Na/x-Ba | 135  | 5.4 | 0                 | 0                 | 0~30              | 0                 |
| 135-Na/x-Zn | 135  | 5.4 | 0                 | 0                 | 0                 | 0~0.3             |

値の単位は mM. 全ての液は 5 mM Hepes を含み, HCl, NaOH, Ca(OH)<sub>2</sub> によって pH が 7.2 に調整された.

表 5 細胞内液

|                        | CsCl | MgCl <sub>2</sub> | EGTA | HEPES |
|------------------------|------|-------------------|------|-------|
| normal                 | 140  | 1                 | 10   | 0     |
| Mg <sup>2+</sup> -free | 140  | 0                 | 10   | 0     |

値の単位は mM. pH は CsOH によって 7.2 にされた.