The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A/Kir6.2 complexK+ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells
Author(s)	奥山, 裕司
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40709
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏　　名	奥　山　裕　司（おく やま ゆう じ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　13735　号
学位授与年月日	平成10年 3 月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	The effects of nucleotides and potassium channel openers on the SUR2A／Kir6.2 complexK^+ channel expressed in a mammalian cell line, HEK293T cells （スルフォニルウレア受容体（SUR2A）と膜2回貫通型カリウムチャネル（Kir6.2）によって再構成されるチャネルに対するヌクレオチドおよびカリウムチャネル開口薬の効果についての検討）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　松澤　佑次 （副査） 教　授　倉智　嘉久　　教　授　堀　　正二

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

スルフォニルウレアレセプター（SUR2A）と膜2回貫通型カリウムチャネル（Kir6.2）によって再構成されるチャネルは，その各サブユニットの組織分布，薬理学的および電気生理学的性質から，心臓および骨格筋に発現しているATP感受性カリウムチャネル（K_{ATP}チャネル）に相当するものとして報告されたが，未だ詳細な検討はなされていない。今回，細胞内ヌクレオチドによる活性調節，カリウムチャネル開口薬およびスルフォニルウレア剤の効果などについて詳細に検討し，SUR2A／Kir6.2によって再構成されるチャネルが心臓および骨格筋K_{ATP}チャネルの種々の性質を再構成するかどうかについて検討した。

【方法】

SUR2AおよびKir6.2cDNAをそれぞれ発現ベクターに組み込み，リポフェクトアミンを用いてヒト胎児腎細胞体（HEK293T細胞）に共発現させ，パッチクランプ法を用いて検討した。whole-cell clamp法ではピペット内容液のカリウム濃度は145mMでATP3mMを添加し，カリウム5.4mMの細胞外液を用いた。cell-attached patchおよびinside-out patchでの実験では，ピペット内容液，細胞外液および細胞内側灌流液中のカリウム濃度は全て145mMで行った。Mg^{2+}無しの条件での実験以外では，ヌクレオチドとMg^{2+}の結合を考慮に入れ，非結合型Mg^{2+}が1.4mMとなるようにMg^{2+}を調整した。

【成績】

1）SUR2AとKir6.2を共発現させた細胞では，whole-cell clamp記録およびcell-attached patchでの単一チャネル記録で，カリウムチャネル開口薬（pinacidil）によって活性化され，特異的K_{ATP}チャネル阻害薬（glibenclamide）で抑制される電流が観察された。inside-out patch（IOパッチ）にすると，cell-attached patchで観察されたものと同様の単一チャネルコンダクタンスを示すチャネルの自然開口が認められ，これは細胞内側に灌流したATPによって可逆的に抑制された。自然開口状態のチャネルは細胞内Mg^{2+}存在下で弱い内向き整流性とバースト状の開口を示し，バースト内での開口時間と閉鎖時間のヒストグラムはともに単一指数関数で近似された。開口時間の時定数は膜の脱分極によって延長したが，閉鎖時間の時定数は電位による変化をほとんど受けなかった。

2）whole-cell clamp 記録では，心臓 K_{ATP} チャネル開口薬である nicorandil，pinacidil によって濃度依存性（それぞれ Kd ≒100 μM，10 μM）に，ほぼ直線的な電流電圧関係を示す電流が活性化され，これは特異的 K_{ATP} チャネル阻害薬である glibenclamide，tolbutamide によって濃度依存性に抑制された（それぞれ Ki ≒160nM，120 μM）。また膵臓 K_{ATP} チャネル開口薬の diazoxide では電流の活性化は生じなかった。

3）IO パッチでの自然開口状態のチャネル活性は時間経過とともに次第に減少した（run-down 現象）。約75％のパッチでは顕著な run-down 現象がみられ，IO パッチ作成後約 1 分間で，チャネル活性は IO パッチ作成直後に得られた最大活性の半分まで減少したが，約25％のパッチでは25分後でも最大活性の半分以上の活性が維持されていた。run-down したチャネルは，Mg^{2+} 存在下に ATP で処理することによって再活性され自然開口状態に復したが，非水解性 ATP アナログでは再活性化されなかった。

4）IO パッチでの自然開口状態のチャネル活性は溶液中の Mg^{2+} の有無に関わらず，ATP によってほぼ同じ potency で抑制された（Ki ≒150 μM，Hill 係数≒ 2）。run-down したチャネルは Mg^{2+} 存在下に UDP によって活性化された（Kd ≒240 μM，Hill 係数≒ 1）。自然開口状態では，UDP は ATP による抑制に対して拮抗的に作用したが，run-down 後に UDP によって活性化されたチャネル活性は自然開口の場合とほぼ同じ potency で ATP によって抑制され，この場合 UDP は ATP に対する拮抗作用を持たなかった。

【総括】

SUR2A と Kir6.2で再構成されるチャネルは，心筋の K_{ATP} チャネルに比較し，ATP に対する感受性が低いことなどの相違点も認められたが，細胞内ヌクレオチドによる活性調節，カリウムチャネル開口薬およびスルフォニルウレア剤に対する反応など心筋 K_{ATP} チャネルの主な薬理学的性質を有しており，これらの性質の分子レベルでの機序を明らかにするうえで有効な実験系となりうると考えられた。また本来の骨格筋 K_{ATP} チャネルは Mg^{2+} 共存下の ATP に比べ，free の ATP により強い感受性を持ち，かつ濃度抑制曲線のヒル係数は約 1 であると報告されており，骨格筋 K_{ATP} チャネルを構成するスルフォニルウレア受容体は SUR2A 以外のものである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は，心臓型および骨格筋型 K_{ATP} チャネルとして報告されたスルフォニルウレアレセプター SUR2A と膜 2 回貫通型カリウムチャネルサブユニット Kir6.2によって再構成されるチャネルの電気生理学的および薬理学性質を詳細に検討したものである。単一チャネルの開閉動態，カリウムチャネル開口薬の選択性，スルフォニルウレア剤の濃度依存性は心筋および骨格筋で報告されている K_{ATP} チャネルの特徴に一致していた。細胞内 ATP による抑制は，Mg^{2+} の有無に関わらず，ほぼ同じ potency で抑制された。これは本論文で初めて明らかにされた特徴で，この再構成されたチャネルが心筋型であることを支持する強い根拠である。骨格筋 K_{ATP} チャネルでは Mg^{2+}-free ATP が Mg ATP より抑制の potency が高いとされており，この点では SUR2A と Kir6.2によるチャネルとは明確に異なる。心筋での報告と同様に，ヌクレオシド二燐酸の一つである UDP は，自然開口状態のチャネルでは ATP による抑制に対して拮抗的に作用したが，run-down 後のチャネルでは UDP は ATP に対する拮抗作用を持たなかった。以上のように本論文では，SUR2A と Kir6.2で再構成されるチャネルは心筋 K_{ATP} チャネルの主な電気生理学的および薬理学的性質を有することが詳細な検討から明らかにされた。また骨格筋 K_{ATP} チャネルは SUR2A 以外のスルフォニルウレア受容体から構成される可能性が示唆された。本論文は心筋 K_{ATP} チャネルの種々の活性調節の機序を分子レベルで明らかにしていくうえで非常に重要な基礎的データを示したもので学位に値するものと認められる。