The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Intramolecular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP-induced Differential control of KATP channels
Author(s)	松下, 賢治
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43794
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

【108】

氏　　名	松下賢治（まつした けんじ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　16905　号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学　位　論　文　名	Intramolelcular interaction of SUR2 subtypes for intracellular ADP-induced Differential control of K_{ATP} channels （ATP感受性カリウムチャネルの細胞内ADPによる活性化機序および分子内制御の構造モデル）
論文審査委員	（主査） 教授　田野　保雄 （副査） 教授　倉智　嘉久　　教授　不二門　尚

論文内容の要旨

【目的】

ATP感受性カリウムチャネル（K_{ATP}チャネル）は細胞内の代謝状態と細胞膜の興奮性を結びつける内向き整流性カリウムチャネルである。K_{ATP}チャネルはスルフォニル尿素受容体（SUR）とポアを形成するKir6.0からなる異種八量体でチャネルの薬剤持性はSURが担っている。SURには3種類（SUR1、SUR2、SUR2B）が単離されているが、その中でSUR2AとSUR2Bはsplicing variantでありC末端の42アミノ酸（C42）を除き全く同一のアミノ酸配列であるが細胞内ADPに対する活性特性は異なっている。SURには二つのヌクレオチド結合ドメイン（NBD）があり、二番目のNBD（NBD2）にADPが結合することでK_{ATP}チャネル活性化することが解っているが、最近我々はSUR2A、SUR2BからなるK_{ATP}チャネルのADPに対する反応性の違いにC42が重要な役割を担っていることを見出した。そのNBD2内でC42がチャネル活性化に関わる機構を構造的に理解するためSURのキメラおよびミュータントを用いた電気生理学的検討およびホモロジーモデルによる検討を行った。

【方法】

二次元構造予測をもとにキメラおよびミュータントSURをSUR2AとSUR2BのC42の間で作成した。それらのSURをKir6.0とHEK293T細胞に共発現させてK_{ATP}チャネルのADPによる活性化をinside-out patch法で測定しADP濃度依存性を調べた。チャネル活性化のグラフからHill fittingを用い最大活性Vmax、ADPの活性化のEC_{50}とそのSUR2BのEC_{50}との相対比EC_{50} ratioを計算し比較検討した。また、構造構築ソフトModeller 4を用いて、ABC蛋白スーパーファミリーの細胞内ドメインであるHisPの構造を鋳型にSUR2AとSUR2BのNBD2ホモロジーモデルを作成した。モデルを評価するためPROCHECKを行った。また別のABC蛋白の細胞内ドメインであるMalKとMJ1267からホモロジーモデルを作成しモデル間の違いをRMSDにて検討した。作成したNBD2モデルと測定結果からC42とADPを結合するWalker Aモチーフ（WA）との相互作用を検討した。

【結果】

1．SUR2AのVmaxは～0.15で、EC_{50}ratio～9とSUR2BのVmaxは～0.43でEC_{50}ratioは1で特に低濃度の反応性に違いがあり、反応性の高いものがSUR2B typeで低いものがSUR2A typeと判定できた。このときモデルから

C42はWAの後面で接していることから、C42がNBD2に対するADPの結合性に関わる可能性が示唆された。
2．C42はα-β-β-α-αという二次元構造が予測されるが、キメラ解析を行った結果、C42の中で中央のβ-βターンの構造がSUR2A typeとSUR2B typeの差異を決定するサイトであると推定された。
3．PROCHECKとRMSDの検討からモデルはC42とWAとの相互作用を検討するのに適切であると考えられた。
4．ミュータント解析の結果、C42上のβ-βターンに電荷を持つ残基（SUR2AではSerとGlu、SUR2BではLysとArg）があり、WA辺縁に位置するArgは近距離に位置することから、C42が静電的にWAの構造を変化させうる。しかしC42上の電荷を持つ残基が静電的にWAに影響するにはさらにそれらを前後で取り囲む疎水性の5残基が必要であった。
5．ミュータント解析の結果、WA上の二つの正電荷をもつ残基ArgとLysはNBDにADPが結合する際、適切なポケットをつくるために重要な残基で、特にArgを介してC42が静電的にWAの構造を変化させる可能性が示唆された。

【総括】
C42は電荷を持つ残基を含む領域を介して静電的にWAの形状を変化させ、NBD2のADP結合性を調節し、K_{ATP}チャネルのADPによる活性化に影響する。このことにより、SUR2AとSUR2BからなるK_{ATP}チャネルのADPに対する反応性の違いにC42が関与する機構が明らかになった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞のシグナル伝達上非常に重要な経路である、細胞内代謝状態と細胞膜興奮性を結びつけるATP感受性K^+チャネル（K_{ATP}チャネル）の構造活性相関についてとりくんでいる。K_{ATP}チャネルは多くの細胞に存在する異種八重体の蛋白で、sulfonylurea受容体（SUR）とカリウムチャネルKir6.0からなる。SURは糖尿病治療薬や血管作動薬のレセプターであり、臨床上も重要な蛋白質である。そのチャネルの細胞内ADPに対する反応特性は各々、SURサブタイプで異なることが解っているが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、分子生物学的キメラミュータントスタディーと電気生理学的実験手法とを組み合わせ、SURの細胞内ADPに対する活性特性上重要な残基を系統的に特定し、またホモロジーモデリングという構造生物学的手法を応用してその残基の構造的意義を考察している。これは今後発展すると思われる構造機能ゲノムを実践している。これらの手法の開発によりレセプターの構造活性相関が3次元構造に基づいてより具体的に解明され、薬剤の副作用発現機序の理解や薬剤の新規開発を可能にするという意味で今後の医学において重要な業績といえる。したがって、本論文は学位授与に値するものと認める。