



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | C-Terminal Tails of Sulfonylurea Receptors Control ADP-Induced Activation and Diazoxide Modulation of ATP-Sensitive K <sup>+</sup> Channels                                                                                                                          |
| Author(s)    | 松岡, 哲郎                                                                                                                                                                                                                                                               |
| Citation     | 大阪大学, 2003, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                     |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/43965">https://hdl.handle.net/11094/43965</a>                                                                                                                                                                                  |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について</a>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 まつ 松 岡 哲 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 7 6 1 2 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 C-Terminal Tails of Sulfonylurea Receptors Control ADP-Induced Activation and Diazoxide Modulation of ATP-Sensitive  $K^+$  Channels (スルホニルウレア受容体の C 末端は ATP 感受性カリウムチャネルの ADP による活性化とジアゾキシドによる修飾を制御する)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 松澤 佑次

(副査)

教 授 倉智 嘉久 教 授 荻原 俊男

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャネルはポア形成サブユニット Kir6.0 とスルホニルウレア受容体 (SUR) の異種 8 量体によって構成される。カリウムチャネル開口薬と ADP による活性化作用に対する感受性は SUR のサブタイプに依存する。SUR のサブタイプは SUR1 (膵島  $\beta$  細胞型)、SUR2A (心筋細胞型) と SUR2B (血管平滑筋細胞型) の 3 種が同定されているが、これらの内 SUR2A と SUR2B は同一遺伝子由来のスプライス変異体で、1546 残基のうち C 末端 42 残基のみが異なる。この C 末端領域に注目すると、SUR2B は SUR2A との間に約 30% の相同性しかないのに対して、むしろ SUR1 とは 70% 以上の相同性がある。カリウムチャネル開口薬の一つであるジアゾキシドは、以前より SUR1 と SUR2B で構成される  $K_{ATP}$  チャネルに対しては活性化作用を示すものの、SUR2A に対しては活性化作用を殆ど示さないとされてきた。しかし、同時にジアゾキシドは虚血時に心筋細胞の活動電位を短縮し、心筋保護作用を有すると言われてきた。さらに最近、高濃度の細胞内 ADP の存在下では SUR2A もジアゾキシドにより活性化されることが報告された。したがって、 $K_{ATP}$  チャネルの ADP とジアゾキシドによる活性化機構への SUR の C 末端の関与が強く示唆されるが、その作用機序を明らかにすることが本研究の目的である

### 〔 方 法 〕

マウス由来の SUR の各サブタイプあるいはその変異体と Kir6.0 のサブタイプの 1 つである Kir6.2 のクローンを HEK293T 細胞に transfection し、細胞膜上に再構築された  $K_{ATP}$  チャネル (SURx/Kir6.2) に対してパッチクランプ法インサイドアウトモードを用いて、ADP とジアゾキシドにより惹起される電流を測定した。

### 〔 成 績 〕

ADP (0~3 mM) は、ATP (1 mM) を含んだ還流液中で、SUR2A/Kir6.2 と SUR2B/Kir6.2 の両方のチャネルを濃度依存的に活性化したが、SUR2B/Kir6.2 の方がより低濃度の ADP で大きな反応を示した。また、ADP 存在下でのジアゾキシド (300  $\mu$ M) は ADP による反応を増幅したが、その最大活性は ADP 単独によるものを超えなかった。

つまりジアゾキシドはそれぞれのチャンネルに対する ADP による活性化作用の  $K_d$  値を大幅に低下させたが、 $V_{max}$  値は変化させなかった。SUR1/Kir6.2 は ADP に対して SUR2B/Kir6.2 と同様に濃度依存的に高い感受性を示し、ジアゾキシドは ADP 単独による最大活性を超える強い活性化作用を示した。しかし SUR1 の C 末端を SUR2A のものと交換したキメラ体のチャンネル (SUR1-2A/Kir6.2) では、ADP による活性化作用は殆ど消失し、ジアゾキシドは ADP の濃度に関わらず最大活性の 20% 程度の一定の活性化作用を示した。

SUR は ATP 結合カセット (ABC) 蛋白に属し、ヌクレオチド結合ドメイン (NBD) と呼ばれる領域を 2 ケ所持つ。ADP は SUR の 2 番目の NBD (NBD2) に結合し、チャンネルを活性化するとされている。SUR2B の NBD2 に点変異を導入したチャンネル (SUR2B(K1348M)/Kir6.2) では ADP とジアゾキシドに対する反応は殆ど消失した。SUR1 の同様の点変異チャンネル (SUR1(K1384A)/Kir6.2) では、ADP に対する反応は殆ど消失するものの、ジアゾキシドに対しては ADP 濃度に関わらず最大活性の 20% 程度の一定の活性のみを示し、SUR1-2A/Kir6.2 と同じような結果になった。

#### [ 総 括 ]

1. SUR の C 末端領域は NBD2 での ADP による活性化機構を制御する。SUR2A の C 末端はこの機構を特異的に阻害するが、SUR1 と SUR2B の C 末端は阻害しない。
2. ジアゾキシドは ADP による活性化機構の efficacy を変化させずに potency を増加することによりチャンネル開口薬として機能している。SUR2A と SUR2B に対するジアゾキシドの効果の差は C 末端による NBD2 での ADP による活性化機構の制御の差に由来する。そのため、心筋細胞型  $K_{ATP}$  チャンネルの、ジアゾキシドによる活性化には大量の ADP を必要とする。
3. SUR1 のジアゾキシドによる活性化には、ADP 依存性と非依存性の 2 つの活性化機構が存在する。

#### 論文審査の結果の要旨

ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャンネルは虚血時の心筋保護やインスリン分泌など生体の重要な生理機能に関与している。これまでに、 $K_{ATP}$  チャンネルはポアを形成する Kir6.0 とスルホニルウレア受容体 (SUR) の異種 8 量体によって構成され、カリウムチャンネル開口薬 (KCO) や ADP による活性化作用に対する感受性は構成する SUR のサブタイプによって決定されることが明らかにされている。KCO の 1 つであるあるジアゾキシド (DZX) は、以前より SUR1 (膵臓型) と SUR2B (平滑筋型) で構成される  $K_{ATP}$  チャンネルに対しては活性化作用を示すものの、SUR2A (心臓型) に対しては殆ど効果がないとされてきた。しかし、以前より DZX には虚血心筋の保護作用があり、高濃度の ADP の存在下では SUR2A も DZX により活性化されることも最近報告された。SUR2A と 2B は同一遺伝子由来のスプライス変異体で、C 末端 42 残基のみが異なるため、この ADP と DZX による活性化機構への SUR の C 末端の関与が示唆されてきたが、具体的な作用機序は未だ明らかにされていない。

本論文では、その作用機序を明らかにするために、培養細胞膜上に様々な  $K_{ATP}$  チャンネルを再構築し、ADP と DZX の効果を分子生物学的手法と電気生理学的手法を用いて検討している。 $K_{ATP}$  チャンネルの ADP による活性化機構は SUR の C 末端側のヌクレオチド結合領域で行われるが、本研究の結果、SUR2A の C 末端はこの機構を特異的に阻害する一方、SUR1 と 2B の C 末端は阻害しないことが明らかになった。また、DZX はこの ADP による活性化作用の efficacy を変化させずに potency を増加することによりチャンネル活性を増幅しており、SUR2A と 2B の DZX による活性化の差はこの C 末端による制御の差に由来することが示唆された。このように、本論文では  $K_{ATP}$  チャンネルの ADP による活性化機構を SUR の C 末端領域が制御すること、またその機構がカリウムチャンネル開口薬の作用機序に深く関与することが初めて報告されており、本論文は博士 (医学) の学位授与に値すると考える。