

氏名	まつおみちのり 松尾道憲
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1128号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	MECHANISM OF $K_{ATP}$ CHANNEL REGULATION BY SUR (スルホニル尿素受容体(SUR)による $K_{ATP}$ チャンネルの制御機構)
論文調査委員	(主査) 教授 天知輝夫 教授 池田篤治 教授 佐々木隆造

### 論文内容の要旨

ATP感受性カリウムチャンネル( $K_{ATP}$ チャンネル)は、カリウムが通過するポアを形成するKir 6.2とその開閉を制御するスルホニル尿素受容体(SUR)から構成され、細胞内ATP/ADP比を感知して開閉することにより、様々な組織において代謝状態を細胞膜電位に変換する重要な役割を果たしている。SUR 1とKir 6.2から成る膵 $\beta$ 細胞の $K_{ATP}$ チャンネルは、血糖値の変化に応じて開閉し、インスリン分泌を制御する。MgADPがSUR 1に作用することによってチャンネルが活性化されると考えられているが、その分子機構は明らかではない。これを明らかにするため、本論文ではSUR 1の2つのヌクレオチド結合領域(NBF 1, NBF 2)のヌクレオチド結合特性を解析し、SUR 1による $K_{ATP}$ チャンネル活性化機構のモデルを提出している。本論文の主な内容は以下の通りである。

#### 1. SUR 1の高親和性ATP結合のチオール修飾試薬*N*-ethylmaleimide (NEM)による阻害

これまでにATP類似体である8-azido- $[^{32}P]$  ATPによる光親和性標識実験から、SUR 1が高親和性ATP結合部位を持つことが示唆されていた。それを確かめるため、高親和性ATP結合に対するNEMの効果を検討した。

8-azido- $[^{32}P]$  ATPの高親和性ATP結合はNEM濃度依存的に阻害されることを見だし、標識はリン酸化によるものではなくATP結合であること、1カ所のNEMによる修飾でATP結合が阻害されることを明らかにした。NBF 1内のシステインをセリンに置換した変異体では、NEMによるATP結合の阻害が起こらないことを明らかにした。これらの結果から、NBF 1が高親和性ATP結合部位であることを示した。また、SUR 1と同じABCスーパーファミリーに属するMDR 1でもNEMによってATP結合が阻害されることが知られており、SUR 1がMDR 1と同様のNEM感受性のATP結合部位を持つことが示された。

#### 2. SUR 1のNBF間の協調的ヌクレオチド結合

MDR 1では2つのNBFが協調的に働くことが知られている。そこで、SUR 1でも協調性があるかどうかを検討した。SUR 1のNBF 1に先に結合した8-azido- $[^{32}P]$  ATPは、後から加えたMgATPまたはMgADPによって安定化されるが、ATPの非加水分解類似体ATP $\gamma$ Sによっては安定化されないことを明らかにした。また、NBF 2のATP結合に関与するリジン(K 1385)とアスパラギン酸(D 1506)の変異体では、安定化の効果がなかった。以上の結果から、NBF 2にMgADPが結合、又は結合したMgATPが加水分解されてMgADPになるとNBF 1のATP結合が安定化されることを明らかにした。

家族性低血糖症(PHHI)を引き起こすSUR 1変異体で、直接的にヌクレオチドとの相互作用を調べた研究はない。そこで、日本人PHHI患者で同定された変異体(R 1420 C, R 1436 Q)の解析を行った。R 1420 C変異体のNBF 1への高親和性ATP結合は野生型と差がないこと、MgATP, MgADPによる高親和性ATP結合の安定化が損なわれていることを明らかにした。このことから、NBF 1とNBF 2の協調的なヌクレオチド結合が $K_{ATP}$ チャンネルの活性化に必要であることが示唆された。また、R 1436 Q変異はSUR 1の発現量を大きく低下させることも明らかにした。

### 3. SUR 1 のヌクレオチド結合特性

SUR 1 の NBF 1, NBF 2 それぞれのドメインを大腸菌で発現させ、それらの精製タンパク質に対する抗体を作製した。トリプシン処理した SUR 1 をそれらの抗体で免疫沈降することによって、2つの NBF のヌクレオチド結合特性をより詳細に検討した。

まず、トリプシン処理により SUR 1 が NBF 1 を含む 35-kDa 断片と NBF 2 を含む 65-kDa 断片に切断されることを明らかにした。次に、SUR 1 を光親和性標識後トリプシン処理し、NBF 1 が  $Mg^{2+}$  非依存性の高親和性 ATP 結合部位、NBF 2 が  $Mg^{2+}$  依存性の低親和性 ATP 結合部位であることを明らかにした。8-azido- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP によって NBF 1 も NBF 2 も標識されたが、8-azido- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP では NBF 1 のみ標識された。この結果から、NBF 2 には加水分解活性があり、NBF 1 には加水分解活性がないか非常に低いことが示唆された。ヌクレオチドに対する親和性を定量的に調べ、NBF 1, NBF 2 ともに ATP, ADP 両方結合すること、NBF 1 が特に ATP に対し高親和性を持ち、NBF 2 が低親和性の ATP, ADP 結合部位であることを明らかにした。

以上の結果から、SUR 1 の NBF 1 に MgATP, NBF 2 に MgADP が結合した形で  $K_{ATP}$  チャネルを活性化するモデルを提出し、SUR 1 が細胞内の MgADP 濃度を感知することによって、膵β細胞のインスリン分泌を調節する  $K_{ATP}$  チャネルを制御している可能性を示した。

### 論文審査の結果の要旨

スルホニル尿素受容体 (SUR) は Kir 6.2 と共に ATP 感受性カリウムチャネル ( $K_{ATP}$  チャネル) を構成する。SUR 1 の遺伝子異常が家族性低血糖症 (PHHI) をもたらすこと、SUR 1 が最も多く用いられる糖尿病治療薬であるスルホニル尿素剤の標的分子であることから、SUR 1 の解析は学術面のみならず医療面からも関心が持たれている。しかし、 $K_{ATP}$  チャネルに関する生化学的解析は近年はじまったばかりであり、その制御の分子機構はまだ分かっていない。

本研究では、SUR 1 の2つのヌクレオチド結合領域 (NBF 1, NBF 2) のヌクレオチド結合特性を明らかにしている。さらに、NBF 間のヌクレオチド結合の協調性を見だし、PHHI の原因となる SUR 1 変異体では協調性が失われることを明らかにしている。そして、SUR 1 による  $K_{ATP}$  チャネル活性化機構のモデルを提出しており、評価すべき点は以下の通りである。

(1) SUR 1 の高親和性 ATP 結合が *N*-ethylmaleimide (NEM) によって阻害されることを見だし、NBF 1 内のシステインをセリンに置換した変異体では阻害が起らないことを明らかにした。その結果、NBF 1 が高親和性 ATP 結合部位であり、SUR 1 が MDR 1 と同様の NEM 感受性の ATP 結合部位を持つことを示した。

(2) SUR 1 の2つの NBF のヌクレオチド結合における協調性を見だし、NBF 2 に MgADP が結合、又は結合した MgATP が加水分解されて MgADP になると NBF 1 の ATP 結合が安定化されることを明らかにした。

(3) PHHI を引き起こす変異の多くで MgADP による  $K_{ATP}$  チャネル活性化が障害されることが分かっているが、直接的にヌクレオチドとの相互作用を調べた研究はなかった。PHHI の原因となる変異体 R 1420 C では NBF 間の協調性が損なわれていることを明らかにした。また、R 1436 Q 変異体では発現量が大きく低下することを明らかにした。

(4) NBF 1 が  $Mg^{2+}$  非依存性の高親和性 ATP 結合部位、NBF 2 が  $Mg^{2+}$  依存性の低親和性 ATP, ADP 結合部位であることを明らかにした。これまで SUR 1 では加水分解活性の存在が分かっていたが、NBF 2 には加水分解活性があり、NBF 1 には加水分解活性がないか非常に低い可能性を示した。

(5) SUR 1 の NBF 1 に MgATP, NBF 2 に MgADP が結合した形で  $K_{ATP}$  チャネルを活性化するモデルを提出し、SUR 1 が細胞内の MgADP 濃度を感知することによって、膵β細胞のインスリン分泌を調節する  $K_{ATP}$  チャネルを制御している可能性を示した。

以上のように本論文は、SUR 1 の2つの NBF とヌクレオチドの相互作用を生化学的に解析した世界で初めての研究であり、SUR による  $K_{ATP}$  チャネル制御機構の解明に重要な知見を与えるものである。新規糖尿病治療薬や家族性低血糖症治療薬の開発にもつながることが期待され、農芸化学、生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 12 年 2 月 10 日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士 (農学) の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。