

氏 名	二宮 智 紀
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2723 号
学位授与の日付	平成 16 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	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Varapamil, a $\text{Ca}^{2+}$ entry blocker, targets the pore-forming subunit of cardiac type $\text{K}_{\text{ATP}}$ channel (Kir6.2) (カルシウム拮抗薬のベラパミルは、ATP感受性カリウムチャネルの孔を形成するサブユニットであるKir6.2に作用する)
論文調査委員	(主 査) 教授 野間昭典 教授 米田正始 教授 北 徹

### 論 文 内 容 の 要 旨

フェニルアルキル系Caブロッカーであるベラパミルは、臨床的に抗不整脈薬として広く用いられているが、一方でネイティブ（猫）の心筋細胞において $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを阻害すること、心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを構成するサブユニットの1つであるSURと同じくABC蛋白の一つであり、腫瘍細胞において抗がん剤に対する耐性（Multi-Drug-Resistance）に關与するMDRも阻害することや、QT延長症候群の原因遺伝子であるHERGチャネルも阻害することが知られており、必ずしもCaチャネルにのみ特異的なブロッカーではないと考えられる。そこでこの実験では、ベラパミルの心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを阻害するメカニズムについて調べた。

哺乳類由来の培養細胞であるCOS7にlipofection法を用いて（心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを構成するサブユニットである）Kir6.2とSUR2Aを導入し、全細胞型電流記録法で $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネル活性を記録した。ベラパミルはこの電流を抑制した。

単一チャネル記録でも、同様に再構築されたKir6.2とSUR2Aからなる心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルはベラパミルによって濃度依存的に抑制され、その $\text{IC}_{50}$ は $8.9\mu\text{M}$ であった。一方Kir6.2は単独では（SURをいっしょに発現させなければ）、細胞膜上に機能的なチャネルを発現しないが、Kir6.2のC末端のアミノ酸を一部欠損させたKir6.2 $\Delta\text{C36}$ はSURがなくても機能的なチャネルを発現できる。そこで、このKir6.2 $\Delta\text{C36}$ を同様に再構築し単一チャネル記録を行ったところ、ベラパミルはこのKir6.2 $\Delta\text{C36}$ チャネルも濃度依存的に抑制した。その $\text{IC}_{50}$ は $11.5\mu\text{M}$ であり、心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを構成する2つのサブユニットのうちSUR2Aではなく、チャネルの孔（ポア）を形成するKir6.2に作用してチャネルを抑制すると考えられた。

またベラパミルは、心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルの単一チャネルコンダクタンスに影響は与えず、チャネルの閉鎖時間を延長させることで開口確率を低下させチャネルを抑制した。

次に $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルのATP感受性を明らかに低下させる変異チャネルをオーバーラップPCR法を用いて作成し、それらのチャネルに対するベラパミルの感受性を検討した。チャネルの開口確率がコントロールと比べ明らかに増加している3つのチャネル（Kir6.2 $\Delta\text{C36}$ -L164C, C166S, T171A）はベラパミル感受性が低下していた。しかし、ATP感受性のみ低下し、開口確立は変化しない3つのチャネル（Kir6.2 $\Delta\text{C36}$ -R50G, K185Q, G344D）においてはベラパミル感受性に変化はなかった。このことから、ベラパミルは $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルが閉鎖状態にある時に高い親和性を持ち、また $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルに対するATPの作用部位とベラパミルの作用部位は同じKir6.2サブユニット上ではあるが異なっていると考えられた。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

抗不整脈薬として広く用いられているCaブロッカーのベラパミルは、ネイティブの心筋細胞において $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを阻害することも知られているが、この実験ではベラパミルが心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを阻害する機序について調べた。

培養細胞にKir6.2とSUR2Aからなる心筋型 $\text{K}_{\text{ATP}}$ チャネルを再構築し、全細胞型電流記録法でチャネル活性を記録した。ベラパミルはこの電流を抑制した。

単一チャネル記録でも、同様に再構築された心筋型  $K_{ATP}$  チャネルはベラパミルによって濃度依存的に抑制された。一方 Kir6.2 は単独では細胞膜上に機能的チャネルを発現しないが、C末端のアミノ酸を一部欠損させた Kir6.2 $\Delta$ C36 は SUR がなくても機能的なチャネルを発現できる。そこで、これを再構築し単一チャネル記録を行ったところ、ベラパミルはこのチャネルも心筋型  $K_{ATP}$  チャネルをと同様に抑制した。従ってベラパミルはチャネルの孔を形成する Kir6.2 に作用すると考えた。

次にベラパミルは、チャネルの単一チャネルコンダクタンスに影響は与えず、チャネルの閉鎖時間を延長させることで開口確率を低下させチャネルを抑制した。

また、 $K_{ATP}$  チャネルの ATP 感受性を明らかに低下させる変異チャネルに対するベラパミルの感受性を検討した結果から、ベラパミルはチャネルが閉鎖状態にある時に高い親和性を持ち、 $K_{ATP}$  チャネルに対する ATP とベラパミルの作用部位は異なっていると考えられた。

以上の研究は、臨床的によく用いられ Ca チャネル以外にも様々なチャネル/トランスポーターに作用することが知られているベラパミルの、 $K_{ATP}$  チャネルに対する作用機序の解明に貢献し、心臓を含め  $K_{ATP}$  チャネルのサブユニットとして Kir6.2 を持つ組織における  $K_{ATP}$  チャネルについての基礎的理解に寄与することが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成16年2月16日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。