

氏 名	謝 来 華
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2080 号
学位授与の日付	平成 11 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	医学研究科生理系専攻
学位論文題目	Wortmannin, an inhibitor of phosphatidylinositol kinase, blocks the MgATP-dependent recovery of Kir6.2-SUR2A channel. (ホスファチジルイノシトールキナーゼの阻害剤であるウォルトマンニンはMgATPによるKir6.2-SUR2Aチャネルの回復を抑制する)
	(主査)
論文調査委員	教授 大森治紀 教授 中西重忠 教授 野間昭典

論 文 内 容 の 要 旨

ATP感受性Kチャネル(以下 K_{ATP} チャネル)は二回膜貫通型内向き整流Kチャネルの一種であるKir6.xサブユニット(Kir 6.1, Kir6.2)と, ATP結合蛋白の一つであるスルフォニル尿素受容体サブユニット(SUR1, SUR2A, SUR2B)によって構成される。 K_{ATP} チャネルは細胞内ATP濃度の低下によって開確率を上昇するが, 細胞内ATPを除去した状態に長く保つと, その活性が徐々に失われること(rundown)が知られている。Rundownしたチャネルの活性は細胞内にMgATPを投与すると, 時間と共に回復すること(MgATP-dependent recovery)から, なんらかのリン酸化反応が関与していることが長年にわたって示唆されてきたが, その機序はまったく不明であった。

近年, 細胞膜を構成する磷脂質の一種であるホスファチジルイノシトール-4, 5-ニリン酸(PIP_2)が心筋細胞のNa-Ca交換体および K_{ATP} チャネルを直接活性化することが, 合衆国のD. Hilgemannらによって報告された。この結果から, K_{ATP} チャネルのMgATP dependent recoveryは, 蛋白質リン酸化反応よりもむしろ膜脂質リン酸化反応によっている可能性が考えられた。この仮説を検討するために, ホスファチジルイノシトール3キナーゼ(PI3 kinase)及びホスファチジルイノシトール4キナーゼ(PI4 kinase)の阻害剤であるwortmanninの K_{ATP} チャネルに対する効果を検討した。

発現ベクターにサブクローニングしたKir6.2およびSUR2AをCOS7細胞に共発現させ, 再構成した K_{ATP} チャネルをinside-out patch clamp法により記録した。0 mM ATP溶液により最大限に活性化した K_{ATP} チャネルに100 μ M Ca^{2+} を投与し, チャネルを急速にrundownさせた(Ca-induced rundown)。続いて, 5 mM MgATPを投与すると, K_{ATP} チャネルの活性はほぼ完全に回復した(99.4 $\pm$ 4.1%, n=13)。次に, 10 μ M wortmannin存在下で同様の実験を行ったところ, MgATP dependent recoveryの程度は有意に減少した(35.5 $\pm$ 7.2%, n=10, p<0.01)。

次に, MgATP dependent recoveryに対する蛋白質リン酸化酵素の阻害剤の効果を, wortmanninの効果と比較した。100 μ M H-7 (protein kinase AおよびC阻害剤), 100 μ M H-8 (protein kinase AおよびG阻害剤), 100 μ M genistein (tyrosin kinase阻害剤), 10 μ M W-7 (calmodulinおよびミオシン軽鎖キナーゼ阻害剤)存在下で, いずれの場合も, ほぼ100%のMgATP dependent recoveryが認められた。しかしながら, 100 μ M wortmannin存在下では, MgATP-dependent recoveryはわずか4.3 $\pm$ 2.5%であった(p<0.01)。

WortmanninによるMgATP dependent recoveryの抑制はPI3 kinaseおよびPI4 kinaseの抑制以外にも, PIP_2 による K_{ATP} チャネルの活性化に直接作用している可能性も否定できない。そこでまずwortmanninでpatch膜を前処置し, MgATP dependent recoveryが抑制されていることを確認した後, PIP_2 を投与した。この場合でも, PIP_2 はチャネルをCa-induced rundownの前のレベルまで再活性化した。これらの結果から, K_{ATP} チャネルのMgATP dependent recoveryはチャネル蛋白のリン酸化でなく, 細胞膜脂質のリン酸化による PIP_2 合成反応であることが示唆された。

次に、 PIP_2 の標的となる分子を同定することを試みた。 Kir6.2 は単独ではチャネルとして機能しないが、そのcarboxyl端から26ないし36アミノ酸を切り取った変異体 ($\text{Kir6.2} \Delta \text{C26}$ ないし ΔC36) はSURサブユニットなしでチャネルとして機能することが知られている。そこで $\text{Kir6.2} \Delta \text{C26}$ を作成し、COS7細胞に発現させ、 MgATP および PIP_2 による再活性化とwortmanninの効果を検討したところ、 $\text{Kir6.2} \Delta \text{C26}$ 単独で $\text{Kir6.2} + \text{SUR 2A}$ と同様の結果が得られ、細胞膜脂質リン酸化反応の標的は Kir6.2 サブユニットであることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

ATP感受性Kチャネル (K_{ATP} チャネル) は筋、神経、分泌細胞などに広く分布し、細胞内ATP濃度の変化を細胞膜興奮性の変化に反映させる機能を担っている。チャネル電流は無ATPで最大となるが、続いて減少し、 MgATP を与えると、その活性が回復する。この MgATP 依存性回復の機序は全く不明であった。一方、最近膜脂質ホスファチジルイノシトール-4, 5-二リン酸 (PIP_2) が K_{ATP} チャネルを活性化することが、Hilgemannらによって報告された。

このチャネル活性維持機構を明らかにするため、COS細胞にチャネルを発現し、パッチクランプ法によって解析した。その結果、 MgATP 依存性回復は蛋白質リン酸化酵素の各種阻害剤 (H-7, H-8, genistein, W-7) で抑制されなかったが、ホスファチジルイノシトールのリン酸化酵素阻害剤であるwortmanninを与えるとほぼ完全に抑制された。wortmannin作用下でも PIP_2 を与えるとチャネル活性は回復した。 K_{ATP} チャネルは、Kチャネルサブユニット (Kir6.2) と、スルフォニル尿素受容体 (SUR 2A) によって構成されるが、 Kir6.2 のみによるチャネル活動でもこれら阻害剤について同様な効果を認めた。

以上の結果より、 K_{ATP} チャネルの MgATP 依存性回復はチャネル蛋白のリン酸化でなく、細胞膜脂質のリン酸化による PIP_2 合成反応によっていることが示唆された。

本研究は、これまで知られていなかった細胞膜脂質のリン酸化によるイオンチャネル活性の制御を示すもので、細胞膜興奮性に関する研究に寄与するところが大きい。

従って、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11年1月18日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。