

氏 名	た な べ こう いち 田 邊 公 一
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1196 号
学位授与の日付	平 成 13 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	REGULATION OF ATP SENSITIVE K ⁺ CHANNEL BY NUCLEOTIDES (ヌクレオチドによる ATP 感受性 K ⁺ 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、細胞内の ATP と ADP の濃度の変化、すなわち細胞の代謝レベルの変化に応じて開閉し、細胞膜電位を調節することによって、インスリン分泌の調節、虚血時の心筋の保護など、さまざまな生理機能を果たしている。K_{ATP} チャンネルは、ATP binding cassette (ABC) トランスポータースーパーファミリーに属する SURx と内向き整流性カリウムチャンネルファミリーに属する Kir6.2 によって構成されており、双方のサブユニットに細胞内のヌクレオチドが相互作用して、開閉の調節がなされていると考えられている。本研究では、生化学的手法を用いて、K_{ATP} チャンネルの複数のヌクレオチド作用部位を個別に解析し、その結合特性を評価した。本論文の主な内容は以下の通りである。

1. ATP は Kir6.2 に直接結合する

野生型の Kir6.2 は、単独では細胞膜表面に輸送されないが、C 末端を数十アミノ酸欠失させた変異 Kir6.2 は単独で細胞膜表面に輸送されて、カリウムチャンネルを形成し、さらにそのチャンネル活性が ATP によって阻害される。この結果から、Kir6.2 のチャンネル活性が細胞内の ATP によって調節を受けることが示唆されたが、ATP が Kir6.2 と直接相互作用するのか、あるいは他の分子を介して作用するのかについては不明であった。そこで本研究では、Kir6.2 と ATP が直接相互作用するかどうかを ATP のアナログである 8-azido [γ -³²P] ATP および [γ -³²P] ATP [γ]-4-azidoanilide を用いた光親和標識実験を行うことによって調べた。Kir6.2 はいずれのアナログによっても光親和標識されるが、[γ -³²P] ATP [γ]-4-azidoanilide によってより強く標識された。また、ATP 感受性を示さない内向き整流性カリウムチャンネル Kir4.1 についても同様の操作を行ったが、Kir6.2 の場合とは異なり、光親和標識は見られなかった。さらに、これらの光親和標識は過剰の ATP の共存下で濃度依存的に減少することから、Kir6.2 は ATP と直接しかも特異的に相互作用していることが明らかになった。また、アミノ酸置換変異 R50G や K185Q をもつ変異 Kir6.2 は ATP によるチャンネル活性阻害を受けにくくなることから、電気生理学的解析から示されている。そこで、これらの変異 Kir6.2 を用いて同様の光親和標識実験を行ったところ、野生型の Kir6.2 と比較して、変異 Kir6.2 の標識量は有意に低かった。以上の結果、ATP は直接 Kir6.2 特異的に相互作用してチャンネルの開閉に関与することを明らかにした。

2. SUR のサブタイプのヌクレオチド結合特性

K_{ATP} チャンネルの構成サブユニットは、膵β細胞では SUR1 と Kir6.2、心筋においては SUR2A と Kir6.2、平滑筋においては SUR2B、Kir6.2 というように各組織において異なっている。チャンネルサブユニットが共通であるにもかかわらず、チャンネルの制御機構あるいは薬理的特質がそれぞれ異なることから、SUR サブユニットのヌクレオチドへの応答性が異なることが示唆されている。そこで、K_{ATP} チャンネルの制御メカニズムをさらに明らかにするため、SURx に存在するそれぞれ 2 つのヌクレオチド結合領域 (NBF) のヌクレオチド結合特性を比較した。

SUR1, SUR2A, SUR2B のそれぞれを 8-azido [³²P] ATP により光親和標識させ、トリプシンで限定加水分解し、抗

NBF1抗体または抗 NBF2抗体を用いた免疫沈降によって、NBF1または NBF2のヌクレオチド結合性を個別に解析した。その結果、SUR のサブタイプのそれぞれ2つの NBF は、いずれもヌクレオチド結合性を有しているが、 Mg^{2+} 依存性や親和性などにおいて異なることが明らかになった。

これらの結果より、以下に示すような K_{ATP} チャンネルの細胞内ヌクレオチドによる開閉制御機構のモデルを提唱した。細胞内の ATP (1~5mM)、ADP (~200 μ M) の濃度を考えると、生理的条件においては NBF1 には高い頻度で ATP が結合しており、NBF2 では $MgATP$ と $MgADP$ の平衡関係が成り立っていると推測される。代謝レベルが変動すると、主に細胞内 ADP 濃度の変化が起こるため、親和性の低い NBF2 のヌクレオチド結合が影響を受ける。それ故、細胞内のヌクレオチド濃度の変化を感知しているのは主に NBF2 であり、 $MgADP$ を結合した NBF2 と ATP を結合した NBF1 が協調的に働いて Kir6.2 のチャンネルの開閉を制御する。

論文審査の結果の要旨

ATP 感受性 K^+ チャンネル (K_{ATP} チャンネル) は、スルフォニル尿素受容体 SURx と内向き整流性 K^+ チャンネル Kir6.2 によって構成されている。 K_{ATP} チャンネルは細胞の代謝レベルの変化によって開閉し、細胞膜電位を調節することによって、様々な重要な生理機能を果たしている。特に膵 β 細胞の K_{ATP} チャンネルは糖尿病の治療薬の標的分子でもあることから、学術的にも臨床的にも重要視されている。 K_{ATP} チャンネルは、これまで電気生理学的手法で解析されてきたが、生化学的解析は近年始まったばかりであり、その制御の分子メカニズムはまだ明らかにはされていない。本研究では SURx のヌクレオチド結合領域 (NBF) と Kir6.2 のヌクレオチド結合特性を明らかにし、 K_{ATP} チャンネルの細胞内ヌクレオチドによる開閉制御モデルを提唱している。評価すべき点は以下の通りである。

(1) Kir6.2 が ATP と直接かつ特異的に相互作用することを 8-azido [^{32}P] ATP および [^{32}P] ATP [γ] -4-azidoanilide の二つの ATP の類似体を用いた光親和標識実験によって世界で初めて明らかにした。また、構造的に大きく異なる二つの ATP 類似体による光親和標識量の違いから、Kir6.2 と ATP の相互作用にアデニンリングの構造が重要であることを示唆した。

(2) ATP によるチャンネル活性阻害効果が大幅に低下した変異 Kir6.2 において ATP との相互作用が有意に低下していることを明らかにした。この結果は、ATP が直接 Kir6.2 に結合することによってチャンネル活性を調節していることを示唆している。

(3) SUR の三つのサブタイプ、SUR1, SUR2A, SUR2B それぞれがもつ二つの NBF の ATP と ADP に対する結合特性を決定した。その結果、SUR1 と比較して SUR2A のヌクレオチドに対する親和性は大幅に低いことが明らかになった。また、SUR2A と SUR2B は、C 末端42アミノ酸以外は同一のアミノ酸配列を有しているにもかかわらず、NBF のヌクレオチドに対する親和性は有意に異なった。

(4) 以上の結果により、SURx と Kir6.2 の双方にヌクレオチドが協調的に相互作用することによって、 K_{ATP} チャンネルの開閉制御が行われていることが明らかとなった。また、NBF のヌクレオチドに対する親和性が SUR サブタイプ間で異なることが、それぞれが構成する K_{ATP} チャンネルのヌクレオチドに対する応答性の違いを生み出すというモデルを提唱した。

以上のように本論文は K_{ATP} チャンネルの二つのサブユニットとヌクレオチドの相互作用を生化学的に解析した初めての研究であり、有効な糖尿病の治療薬、血管拡張剤などの開発にも貢献するものと考えられる。

よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として価値のあるものと認める。

なお、平成13年2月8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。