

19980034

平成10年度厚生科学研究費補助金
(厚生科学特別研究事業)

脳虚血障害の防御機構の解明

課題番号 H10-特別-002

総括研究報告書

主任研究者 稲垣暢也

(秋田大学医学部教授)

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）
総括研究報告書

脳虚血障害の防御機構の解明

主任研究者 稲垣 暢也 秋田大学教授

研究要旨

K_{ATP}チャネルの脳虚血障害の防御機構における役割を検討し、以下の点を明らかにした。

1. 黒質神経細胞には SUR1 と Kir6.2 で構成される膵β細胞型 K_{ATP}チャネルが発現している。
 2. 黒質神経細胞をグルコース無添加液にて灌流時、細胞膜は過分極するが、この過分極には K_{ATP}チャネルが主に寄与している。
 3. G蛋白質の特にαサブユニットが K_{ATP}チャネルを直接制御している。
- 以上の結果から、神経細胞において、K_{ATP}チャネルは虚血時に開口し細胞の興奮を抑制することにより細胞保護作用を有する可能性が強く示唆された。

A. 研究目的

脳梗塞は我が国の死亡原因の多くを占めるだけでなく、脳梗塞の後遺症は患者にとって身体的、精神的ならびに経済的な負担が重くのしかかる。したがって、脳梗塞による脳障害を未然に軽減する予防的処置あるいは発症後の障害を軽減する治療が可能になれば、我が国の保険医療の向上に大いに貢献するものと期待される。

脳において一時的虚血を起こした後に、再び虚血が起きると、その虚血障害が遅延あるいは軽減する現象がよく知られている。このような虚血時の細胞保護作用は ischemic preconditioning と呼ばれ、心臓でも同様に認められる。最近では、心筋や脳の ischemic preconditioning に ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャネルが深く関与していることが示唆されている。本研究では、世界に

先駆けて K_{ATP}チャネルの分子構造を明らかにした申請者らが、脳の K_{ATP}チャネルを同定し、脳虚血における K_{ATP}チャネルの意義を解明することを目的とした。

B. 研究方法

我々はこれまでに K_{ATP}チャネルが ABC 蛋白質であるスルホニル尿素受容体 SUR と内向き整流性 K⁺チャネル Kir6.2 の2種類のサブユニットの複合体であることを明らかにした (Inagaki, et al. Science 270: 1166, 1995; Inagaki et al., Neuron 16: 1011, 1996)。膵β細胞型 K_{ATP}チャネル (SUR1/Kir6.2) と心筋型の K_{ATP}チャネル (SUR2A/Kir6.2) は抗糖尿病薬として知られる代表的なスルホニル尿素剤グリベンクラミドやチャネル開口薬であるジアゾキサイドに対する反応性が大きく異なる。これらは両者における

SUR サブユニットの相違による。従来より、脳におけるグリベクアラミドの結合実験から、黒質に K_{ATP} チャンネルが多量に発現することが知られていた。しかし、脳には Kir6.2 のほか、SUR1 と SUR2A の発現が認められ、神経細胞が膵 β 細胞型あるいは心筋型のいずれの K_{ATP} チャンネルを発現しているかについては不明である。そこでマウスの脳より黒質神経細胞を単離し、その電気生理学的ならびに薬理学的特性を検討することにより神経細胞の K_{ATP} チャンネルの同定を試みた。また、Kir6.2 遺伝子を破壊することによって作成した K_{ATP} チャンネルノックアウトマウスの黒質細胞を用いて、同様の検討を行った。このマウスでは膵 β 細胞型 K_{ATP} チャンネル (SUR1/Kir6.2) と心筋型の K_{ATP} チャンネル (SUR2A/Kir6.2) に共通の Kir6.2 遺伝子を破壊することによって両方の K_{ATP} チャンネルが同時に破壊されるものと思われる。さらに、対照ならびにノックアウトマウスから単離した黒質神経細胞をグルコース無添加液にて灌流した時の細胞膜電位を記録した。細胞膜電位は、パッチクランプ法にて whole-cell 記録を電流固定モードにて行った。細胞はギガシール形成後にグルコース無添加液にて灌流した。さらに、スルホニル尿素剤であるトルブタミドあるいはジアゾキサイドを含む標準液にて灌流し、これらの薬剤に対する反応性について検討した。一方神経細胞では、様々な神経伝達物質が G 蛋白質に共役する受容体を介してシグナル伝達を行っている。特に虚血時にはグルタミン酸をはじめとする種々の神経伝達物質が放出される。しかし、G 蛋白質による K_{ATP} チャンネルの調節機構に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、COS1 細胞に

膵 β 細胞型の K_{ATP} チャンネル (SUR1/Kir6.2) あるいは心筋型の K_{ATP} チャンネル (SUR2A/Kir6.2) を再構成し、再構成チャンネル電流に及ぼす G 蛋白質の効果をパッチクランプ法を用いて電気生理学的に検討した。

C. 研究結果

対照マウスの単離黒質神経細胞は、ギガシール形成直後に大部分に自発放電が認められた。灌流液をグルコース無添加液に置換した後、多くの細胞に膜電位の過分極方向へのシフトが認められた。膜電位の変化は大部分 8 分以内に認められ、同時に自発放電の頻度が低下した。また単離黒質細胞の大部分で、トルブタミドによる脱分極やジアゾキサイドによる過分極が認められた。一方、Kir6.2 ノックアウトマウスの単離黒質神経細胞を用いた検討では、トルブタミドやジアゾキサイドに反応する細胞は存在せず、しかもグルコース無添加液で灌流しても細胞膜の過分極は認められなかった。

次に、再構成 K_{ATP} チャンネル電流に及ぼす G 蛋白質の効果について検討を行った。抑制性 G 蛋白質の α サブユニットである $G\alpha-i1$ は膵 β 細胞型 K_{ATP} チャンネル (SUR1/Kir6.2) を 200% 活性化したのに対して、心筋型の K_{ATP} チャンネル (SUR2A/Kir6.2) は 30% 活性化したにすぎなかった。一方、 $G\alpha-i2$ は膵 β 細胞型 K_{ATP} チャンネルを活性化せず、心筋型の K_{ATP} チャンネルのみを 30% 活性化した。また、 $G\alpha-i1$ あるいは $G\alpha-i2$ 由来の $\beta\delta$ サブユニットはいずれの K_{ATP} チャンネルに対しても効果は認められなかった。

D. 考察

再構成系の実験系によれば、膵 β 細胞型 K_{ATP} チャンネル (SUR1/Kir6.2) はジアゾキサイドに反応するが、心筋型 K_{ATP} チャンネル (SUR2A/Kir6.2) は反応しない。したがって、 K_{ATP} チャンネルのジアゾキサイドに対する反応性は SUR1 によって決定される。今回の結果ではマウスの単離黒質細胞でジアゾキサイドによる反応性が認められた。また、黒質にはグリベンクラミドが高親和性に結合することや、SUR1 のグリベンクラミドに対する親和性が SUR2A に比して著しく高いことから、黒質神経細胞には SUR1 が発現していることが強く示唆される。最近の *in situ hybridization* 法を用いた研究では、SUR1 は Kir6.2 と脳内で共存することが報告されており、黒質神経細胞の K_{ATP} チャンネルは SUR1 と Kir6.2 からなる膵 β 細胞型である可能性が強いと考えられた。今後、単一チャンネルの電気記録を行うことにより黒質神経細胞の K_{ATP} チャンネルの電気生理学的特性をさらに詳細に検討する必要があると考えられる。

また、本研究によってグルコース無添加の灌流液中にて黒質細胞の細胞膜が次第に過分極することも明らかとなった。この、過分極がトルブタミド添加によってもとの膜電位に復帰することから、この過分極は K_{ATP} チャンネルの開口による可能性が強い。この結果は神経細胞においても、心筋細胞と同様に K_{ATP} チャンネルが虚血時に開口し細胞の興奮を抑制することによって細胞保護作用を有している可能性を示唆するものである。

Kir6.2 ノックアウトマウスの単離黒質神経細胞を用いた検討では、トルブタミドや

ジアゾキサイドに反応せず、グルコース無添加液による灌流後細胞膜の過分極は認められなかった。この結果は、以上の考察を強く支持するものであり、今後このノックアウトマウスを用いた虚血実験を行う予定である。

一方、再構成 K_{ATP} チャンネル電流に及ぼす G 蛋白質の効果の検討により、G 蛋白質の特に α サブユニットが K_{ATP} チャンネルを直接調節していること、 $\beta\delta$ サブユニットは効果を示さないこと、が明らかになった。また、膵 β 細胞型 K_{ATP} チャンネル (SUR1/Kir6.2) と心筋型 K_{ATP} チャンネル (SUR2A/Kir6.2) は抑制性 G 蛋白質の α サブユニットである $G\alpha-i1$ や $G\alpha-i2$ による調節様式が異なっており、その差異は SUR サブユニットの相違によることが示唆された。

E. 結論

黒質神経細胞には膵 β 細胞型 K_{ATP} チャンネル (SUR1/Kir6.2) が発現し、虚血時の過分極にはこのチャンネルが強く関与している。また、 K_{ATP} チャンネルは G 蛋白質の特に α サブユニットによって直接制御されていることも明らかになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sanchez, J. A., Gono, T., Inagaki, N., Katada, T., and Seino, S. (1998) Modulation of reconstituted ATP-sensitive K^+ channels by GTP-binding proteins. *J. Physiol.* 507: 315-324

Inagaki, N., and Seino, S. (1998) ATP-sensitive potassium channels: structures, functions, and

pathophysiology. Jpn. J. Physiol. 48: 397-412

ルコースを用いた単一細胞におけるグルコース取り込み・機能連関の観察. 第76回日本生理学会 (長崎)

2. 学会発表

稲垣暢也 (1998) ATP 依存性 K⁺ チャンネル異常. 第32回糖尿病学の進歩・トピックス (仙台) (「ATP 感受性 K⁺ チャンネルと糖尿病」糖尿病学の進歩' 98 第32集 pp.189-194、日本糖尿病学会編、診断と治療社、東京)

稲垣暢也 (1998) 単離 K_{ATP} チャンネルの構造と機能. 第71回日本薬理学会年会・シンポジウム (京都)

稲垣暢也 (1998) 糖尿病の成因の分子生物学. 第9回日本老年医学会東北地方会・シンポジウム (盛岡)

鈴木雅一、藤倉恵子、高田邦昭、稲垣暢也、清野 進 (1998) ATP 感受性 K⁺ (K_{ATP}) チャンネルの膵臓における分布. 第23回日本比較内分泌学会大会

河木 潤、長嶋一昭、三木隆司、稲垣暢也、清野 進 (1998) グリベンクラミド長期処置における膵β細胞機能の解析. 第71回日本内分泌学会学術総会 (福岡)

堀本直幹、山田勝也、中田正範、稲垣暢也 (1998) 蛍光指示2-デオキシグルコースを用いた単一細胞におけるグルコース取り込みの観察. 第31回東北生理談話会 (山形)

山田勝也、堀本直幹、中田正範、松岡英明、稲垣暢也 (1999) 蛍光指示2-デオキシグ

19980034

これ以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Sanchez JA, Gono T, Inagaki N, Katada T, Seino S. Modulation of reconstituted ATP-sensitive K(+)-channels by GTP-binding proteins in a mammalian cell line. *J Physiol.* 1998 Mar 1;507 (Pt 2):315-24.

Inagaki N, Seino S. ATP-sensitive potassium channels: structures, functions, and pathophysiology. *Jpn J Physiol.* 1998 Dec;48(6):397-412.