ATP 感受性 K^+ チャネルの基礎と臨床

不整脈発生における ATP 感受性 K^+ チャネルの役割： 遺伝子改変マウスを用いた解析

中谷晴昭 渡部恭大 松本明郎

ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルは 4 つの 2 回膜貫通型のポアサブユニット (Kir6.x) とそれを取り囲む 4 つの調節蛋白であるスルフォニル尿素受容体 (SUR) から構成される。これまでの遺伝子改変動物を用いた研究から、心筋の K_{ATP} チャネルは Kir6.2 と SUR2A から構成され、血管の K_{ATP} チャネルは Kir6.1 と SUR2B から構成されることが明らかとなっている。また、心筋細胞膜 K_{ATP} チャネルは心筋虚血時の活動電位幅短縮、虚血プレコンディショニングに重要な役割を果たすことを示している。最近、特発性心室細動を起こす疾患として J 波症候群が注目されているが、その一部の原因として、Kir6.1 をコードする *KCNJ8* 遺伝子のミスセンス変異 (S422L) による機能亢進とする仮説が提唱されている。この仮説を検証するため、われわれは心筋細胞に野生型 Kir6.1 (TGWT)、あるいは S422L 変異型 Kir6.1 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (TGmt) を作製し、機能解析を行った。TGWT マウスおよび TGmt マウスの心電図において J 波の変化、ST 部分低下とともに QT 間隔の延長が観察された。これらのマウスの心室筋細胞では、野生型 (WT) マウス心室筋細胞に比し活動電位幅が延長しており、電位依存性 K^+ 電流の密度および内向き整流 K^+ 電流の密度が低下していた。また、TGWT および TGmt 心室筋細胞では、 K_{ATP} チャネル電流密度は WT 心室筋細胞に比して低下し、TGWT 心室筋細胞と TGmt 心室筋細胞間で比較しても K_{ATP} チャネル活動に差がなく、TGmt 心室筋細胞で K_{ATP} チャネル機能が亢進しているという現象は認められなかった。これらの実験成績から、Kir6.1 の変異が J 波症候群の直接的原因であるとする仮説は否定的であり、Kir6.2 をポア成分とする心筋細胞膜 K_{ATP} チャネルが代謝的負荷のかかった心筋細胞における適応反応において、大きな役割を果たすと考えられる。

(心電図, 2018 ; 38 : 135 ~ 141)

Keywords

- ATP 感受性 K^+ チャネル
- Kir6.1
- Kir6.2
- 遺伝子改変動物
- J 波症候群

千葉大学大学院医学研究院薬理学
(〒 263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町 1-33)

I. ATP 感受性 K^+ チャネルの分子構造

約 35 年前、Noma によって心筋細胞に ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルが存在することが初めて明らかにされた¹⁾。その後、1990 年代の半ばになり、Seino らのグループにより K_{ATP} チャネルの分子構造の概要が明らかとなっている²⁾。すなわち、 K_{ATP}

Role of ATP-Sensitive K^+ Channels in Cardiac Arrhythmias : Electrophysiological Analyses Using Genetically Manipulated Mice
Haruaki Nakaya, Yasuhiro Watanabe, Akio Matsumoto

図 1

ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルの分子構造
 K_{ATP} チャンネルは 4 つの 2 回膜貫通型のポアサブユニット (Kir6.x) とそれを取り囲む 4 つの調節蛋白であるスルフォニル尿素受容体 (SUR) から構成され、SUR には二つのヌクレオチド結合部位 (Nucleotide Binding Folds : NBF) が存在する。SUR には、SUR1, SUR2A, SUR2B の 3 種類の分子種が存在し、ポア成分には Kir6.1 と Kir6.2 の 2 種類があり、各種臓器においてこれらの組み合わせが異なっている。

〔文献 3〕より引用改変〕

チャンネルは 4 つの 2 回膜貫通型のポアサブユニット (Kir6.x) とそれを取り囲む 4 つの調節蛋白であるスルフォニル尿素受容体 (SUR) から構成される (図 1)。その後、何種類かの遺伝子改変動物が作製され、それらを使用した機能的実験によってさまざまな臓器に存在する K_{ATP} チャンネルの役割および分子種が明らかとなってきた³⁾。われわれの研究を含めて遺伝子改変動物を用いた研究がいくつか行われ、心血管系の K_{ATP} チャンネルの機能分子としては、心筋の K_{ATP} チャンネルは Kir6.2 と SUR2A から構成され、血管の K_{ATP} チャンネルは Kir6.1 と SUR2B から構成されることが明らかとなった。

II. 遺伝子改変動物から明らかとなった心血管系 K_{ATP} チャンネルの役割

Kir6.2 ノックアウトマウス心室筋細胞では、 K^+ チャンネル開口薬ピナシジルによる外向き K^+ 電流の増強や活動電位幅の短縮は認められず、細胞膜を ATP フリー液に曝露しても単一 K_{ATP} チャンネル活動は記録されないため、心筋細胞 K_{ATP} チャンネルのポア成分には Kir6.2 蛋白は必須であることが明らかとなった⁴⁾。一方、この Kir6.2 ノックアウトマウスの大動脈標本ではピナシジルによる弛緩反応は維持さ

れており、血管平滑筋の K_{ATP} チャンネルのポア成分には Kir6.2 は重要ではないことが示された⁴⁾。その後の Kir6.2 ノックアウトマウスを用いた実験によって、われわれは Kir6.2 をポア成分とする心筋細胞 K_{ATP} チャンネルは虚血プレコンディショニングによる心筋保護に必須であることを明らかにするとともに⁵⁾、虚血時の心筋活動電位幅短縮に参与するものの、心筋虚血時の細胞外 K^+ 蓄積には必須でないことも報告している⁶⁾。

一方、Kir6.1 ノックアウトマウスでは、異なった表現型が観察された。すなわち、Kir6.1 ノックアウトマウスでは突然死が認められ、テレメトリーシステムを用いて心電図記録を行うと、突然死前に房室ブロックを起こしていることが明らかとなった⁷⁾。この Kir6.1 ノックアウトマウスでは、その摘出大動脈標本において、 K^+ チャンネル開口薬であるピナシジルに対する弛緩反応は、消失するとともに麦角アルカロイドの投与で冠動脈が容易に攣縮を起こした。これらの実験結果から、Kir6.1 は血管平滑筋の K_{ATP} チャンネルの機能に必須であり、その機能消失は異型狭心症という表現型として現れることが明らかとなった⁷⁾。

これまでの多くの研究から、それぞれの臓器で機

図 2
各種臓器の ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャンネルの構成分子種

能する K_{ATP} チャンネルの構成分子が異なっており、心筋および骨格筋の K_{ATP} チャンネルは $Kir6.2 + SUR2A$ であり、血管平滑筋および内臓平滑筋の K_{ATP} チャンネルは $Kir6.1 + SUR2B$ 、膵 β 細胞の K_{ATP} チャンネルは $Kir6.2 + SUR1$ 、神経の K_{ATP} チャンネルは $Kir6.2 + SUR1$ とされている(図 2)。

Ⅲ. J 波症候群の原因としての $Kir6.1$ 遺伝子異常の可能性

最近、致死的不整脈を起こす原因として J 波症候群が注目され、早期再分極症候群(early repolarization syndrome)と Brugada 症候群もこのなかに包含される疾患群としてとらえられるようになってきている⁸⁾。また、J 波症候群の一部には $Kir6.1$ をコードする $KCNJ8$ 遺伝子の変異によるという報告がなされ⁹⁾、この遺伝子の S422L ミスセンス変異は培養細胞を用いた再構成系で $SUR2A$ と共発現させることにより、ATP 感受性低下による機能亢進(gain-of-function)が観察されたとの報告がなされている^{10), 11)}。

これまでの遺伝子改変動物を用いたわれわれの機能実験では、 $KCNJ8$ 遺伝子でコードされる $Kir6.1$

は血管平滑筋 K_{ATP} チャンネルの機能には重要であるものの、心筋細胞 K_{ATP} チャンネルにおける機能的重要性は証明されていない。そこで、野生型 $Kir6.1$ 、あるいは S422L 変異型 $Kir6.1$ を過剰発現させたトランスジェニックマウスを用いて、S422L 変異が J 波症候群の遺伝的要因となるか否かについて検討することとした。

Ⅳ. 野生型および S422L 変異型 $Kir6.1$ を心筋細胞に過剰発現したマウスの電気生理学的解析

心筋細胞に野生型 $Kir6.1$ (TGWT)、あるいは S422L 変異型 $Kir6.1$ を過剰発現させたトランスジェニックマウス (TGmt) を作製し、10～20 週齢のマウスから心電図記録を行うとともに、酵素的に単離した心室筋細胞からの活動電位記録、膜電流記録、そして単一 K_{ATP} チャンネル電流記録を行い、同週齢の野生型マウス (WT) から得られたそれらと比較し、機能亢進が観察されるか否かについて検討を行った¹²⁾。

麻酔下で心電図を記録すると、TGWT マウスおよび TGmt マウスでは WT マウスとは異なった体

図3 麻酔下の野生型マウス(WT)および心筋細胞に野生型 Kir6.1 (TGWT) あるいは S422L 変異型 Kir6.1 を過剰発現させたトランスジェニックマウス(TGmt) から記録した代表的体表面心電図波形(胸部誘導 V₅)

上段は全体の心電図波形を示し、下段は円で囲んだ部分の拡大部分を示している。TGWTマウスおよび TGmtマウスではJ波の増高あるいはJ波幅の拡大が認められ、個体によってはST低下も認められたが、最も著明な変化はQT間隔の延長であった。

[文献 12) より引用改変]

表面心電図を示した¹²⁾。正常な WTマウスにおいてもJ波は観察されるが、TGWTマウスおよび TGmtマウスではJ波の増高あるいはJ波幅の拡大が認められ、個体によってはST低下も認められた(図3)。最も特徴的な変化はTGWTマウスおよび TGmtマウス心電図におけるQT間隔の延長であり、WTマウスのQT間隔に比して有意の延長が観察された¹²⁾。

次に、酵素的に単離した心室筋細胞から、カレントクランプモードで活動電位を記録すると、TGWTおよび TGmt心室筋細胞では活動電位幅(APD)はWT心室筋細胞のAPDに比して延長していた¹²⁾。また、これらの心室筋細胞において膜電流系をホールセルクランプモードで解析すると、TGWTおよび TGmt心室筋細胞で一過性外向き電流(I_{to})や遅延整流 K^+ 電流(I_K)といった電位依存性 K^+ 電流の密度および内向き整流 K^+ 電流(I_{K1})密度が、WT心室筋細胞のそれらの K^+ 電流密度に比し

低下しており、APD延長の主な原因と考えられた¹²⁾。

これらの単離心室筋細胞において、ピナシジルによって誘発されるグリベンクラミド感受性 K_{ATP} 電流密度を測定した。電位依存性 K^+ 電流密度と同様に、ピナシジル誘発 K_{ATP} 電流密度はWT心室筋細胞に比し、TGWTおよび TGmt心室筋細胞において低下していた(図4)¹²⁾。また、オープンセルアタッチドパッチから単一 K_{ATP} チャンネル電流を記録し、内膜側灌流液のATP濃度を変化させ、開口確率(NP)の変化を観察した。内膜側灌流液ATP濃度を $1\mu M$ とした対照時の開口確率はWT心室筋細胞に比し、TGWTおよび TGmt心室筋細胞で低下していたが、単一 K_{ATP} チャンネル電流のコンダクタンスには差が認められなかった(図4)。また、灌流液のATP濃度を上昇させると開口確率は低下するが、3群の心室筋細胞間でATPに対する IC_{50} 値に有意の差は認められなかった¹²⁾。このように、WT心室筋細胞に比し、TGWTおよび TGmt心室筋細胞で

図4 WT, TGWTおよびTGmt心室筋細胞におけるピナシジル($100 \mu M$)誘発 K_{ATP} 電流(上段)とこれらの心室筋細胞のオープンセルアタッチドパッチから記録した単一 K_{ATP} チャンネル電流(下段)

上段はホールセルクランプモードで全細胞電流を記録，ランプパルスプロトコルを用いて得られた疑似定常電流を示している．ピナシジル(Pina)の投与で外向き K^+ 電流が増強したが，WT細胞で最も K_{ATP} 電流密度が高く，それよりTGmt細胞やTGWT細胞でその電流密度は低かった．これらの電流は， $10 \mu M$ のグリベンクラミド(Glib)で対照時のレベルまで戻った．下段は電極電位を $+40 mV$ に保持したときの単一 K_{ATP} チャンネル電流を示している．WT細胞では微量のATP濃度($1 \mu M$)では高い開口確率を示すが，TGmt細胞やTGWT細胞では対照時の開口確率はWT細胞に比し低かった．どの心室筋細胞においても細胞膜内側のATP濃度を $100 \mu M$ に上げると，同様に開口確率は低下した．

〔文献12)より引用改変〕

はピナシジル誘発 K_{ATP} 電流密度および単一 K_{ATP} チャンネル電流の開口確率は低下しているものの，ATP感受性やコンダクタンスといった質的差異は3群間で認められなかった．

V. 考察とまとめ

これまでの遺伝子改変動物を用いた機能研究により，多くのことが明らかとなった．例えば，心筋細胞の K_{ATP} チャンネルの機能にはKir6.2という2回膜貫通型ポア蛋白が必須であり，この細胞膜 K_{ATP} チャンネルは心筋虚血時の活動電位幅短縮，虚血プレコンディショニングに重要な役割を果たすことが明

らかとなった^{5), 6)}．また，Kir6.1をポア成分とする細胞膜 K_{ATP} チャンネルは血管平滑筋の機能維持に重要であり，その機能失調は冠動脈攣縮を惹起する可能性があることを示してきた⁷⁾．

最近，特発性心室細動を起こす疾患としてJ波症候群が注目され，Brugada症候群と早期再分極症候群が包含されると考えられている⁸⁾．このJ波症候群の一部にKir6.1をコードする *KCNJ8* 遺伝子のミスセンス変異(S422L)を有するものが報告され⁹⁾，同変異は K_{ATP} チャンネルの機能亢進を生じることが培養細胞系を用いた再構成系実験結果から報告された^{10), 11)}．そこで，われわれは野生型 Kir6.1，ある

いは S422L 変異型 Kir6.1 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、この仮説を検証した¹²⁾。心筋細胞に野生型 Kir6.1 (TGWT)、あるいは S422L 変異型 Kir6.1 を過剰発現させたトランスジェニックマウス (TGmt) では、体表面心電図において J 波の変化、ST 部分低下とともに QT 間隔が延長していた。そして、単離心室筋細胞において WT 心室筋細胞に比し、活動電位幅が延長し、電位依存性 K^+ 電流密度および内向き整流 K^+ 電流密度が低下していた。また、TGWT マウスおよび TGmt マウス心室筋細胞では、 K_{ATP} チャネル電流密度は WT 心室筋細胞と比べて有意に低下し、TGWT 心室筋細胞と TGmt 心室筋細胞を比較しても K_{ATP} チャネル活動に差がなく、TGmt 心室筋細胞において K_{ATP} チャネル活動が亢進しているという実験結果は得られなかった¹²⁾。これらの実験成績は、J 波症候群の原因を *KCNJ8* 遺伝子の S422L 変異とする仮説を支持するものではなかった。最近、アシュケナジー系ユダヤ人において *KCNJ8* 遺伝子の S422L 変異が比較的高い頻度 (約 4%) で認められるものの、それらが J 波症候群特有の心電図所見を示すことはほとんどないとの報告もなされている¹³⁾、日本人 230 例の J 波症候群の遺伝子解析でも *KCNJ8* 遺伝子の変異は発見されなかったという報告もなされている¹⁴⁾。

われわれの遺伝子改変動物を用いた研究は、Kir6.1 の変異が J 波症候群の直接的原因となるという見解に対しては否定的であり、Kir6.2 をボア成分とする心筋細胞膜 K_{ATP} チャネルが代謝的負荷のかかった心筋細胞における適応反応には重要な役割を果たすことを示している。

謝辞

本総説に関連した研究遂行にご協力いただきました千葉大学医学研究院薬理学教室の皆様、そして遺伝子改変動物の供与を頂きました千葉大学医学研究院代謝生理学三木隆司先生、神戸大学清野進先生に深く感謝いたします。本研究の一部は科学研究費補

助金 (No. 26460334, No. 26670119) によって行われたものである。

【文 献】

- 1) Noma A : ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature*, 1983 ; 305 : 147 ~ 148
- 2) Inagaki N, Gonoi T, Clement JP, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J : Reconstitution of $I_{K,ATP}$: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 1995 ; 270 : 1166 ~ 1170
- 3) Seino S, Miki T : Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K^+ channels. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003 ; 81 : 133 ~ 176
- 4) Suzuki M, Li RA, Miki T, Uemura H, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Ogura T, Seino S, Marban E, Nakaya H : Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ Res*, 2001 ; 88 : 570 ~ 577
- 5) Suzuki M, Sasaki N, Miki T, Sakamoto N, Ohmoto-Sekine Y, Tamagawa M, Seino S, Marban E, Nakaya H : Role of sarcolemmal K_{ATP} channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest*, 2002 ; 109 : 509 ~ 516
- 6) Saito T, Sato T, Miki T, Seino S, Nakaya H : Role of ATP-sensitive K^+ channels in electrophysiological alterations during myocardial ischemia : a study using Kir6.2-null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005 ; 288 : H352 ~ H357
- 7) Miki T, Suzuki M, Shibasaki T, Uemura H, Sato T, Yamaguchi K, Koseki H, Iwanaga T, Nakaya H, Seino S : Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nat Med*, 2002 ; 8 : 466 ~ 472
- 8) Antzelevitch C : Genetic, molecular and cellular mechanisms underlying the J wave syndromes. *Circ J*, 2012 ; 76 : 1054 ~ 1065
- 9) Haissaguerre M, Chatel S, Sacher F, Weerasooriya R, Probst V, Loussouarn G, Horlitz M, Liersch R, Schulze-Bahr E, Wilde A, Kaab S, Koster J, Rudy Y, Marec HL, Schott JJ : Ventricular fibrillation with prominent early repolarization associated with a rare variant of *KCNJ8/K_{ATP}* channel. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2009 ; 20 : 93 ~ 98
- 10) Medeiros-Domingo A, Tan BH, Crotti L, Tester DJ, Eckhardt L, Cuoretti A, Kroboth SL, Song C, Zhou Q, Kopp D, Schwartz PJ, Makielski JC, Ackerman MJ : Gain-of-function mutation, S422L, in the *KCNJ8*-encoded cardiac K_{ATP} channel Kir6.1 as a pathogenic substrate

- for J wave syndromes. *Heart Rhythm*, 2010 ; 7 : 1466 ~ 1471
- 11) Barajas-Martinez H, Hu D, Ferrer T, Onetti CG, Wu Y, Burashnikov E, Boyle M, Surman T, Urrutia J, Veltmann C, Schimpf R, Borggreffe M, Wolpert C, Ibrahim BB, Sanchez-Chapula JA, Winters S, Haissaguerre M, Antzelevitch C : Molecular genetic and functional association of Brugada and early repolarization syndromes with S422L missense mutation in *KCNJ8*. *Heart Rhythm*, 2012 ; 9 : 548 ~ 555
 - 12) Watanabe Y, Matsumoto A, Miki T, Seino S, Anzai N, Nakaya H : Electrophysiological analyses of transgenic mice overexpressing *KCNJ8* with S422L mutation in cardiomyocytes. *J Pharmacol Sci*, 2017 ; 135 : 37 ~ 43
 - 13) Veeramah KR, Karafet TM, Wolf D, Samson RA, Hammer MF : The *KCNJ8*-S422L variant previously associated with J-wave syndromes is found at an increased frequency in Ashkenazi Jews. *Eur J Hum Genet*, 2014 ; 22 : 94 ~ 98
 - 14) Wang Q, Ohno S, Kato K, Fukuyama M, Makiyama T, Kimura H, Naiki N, Kawamura M, Hayashi H, Horie M : Genetic screening of *KCNJ8* in Japanese patients with J-wave syndromes or idiopathic ventricular fibrillation. *J Arrhythm*, 2013 ; 29 : 261 ~ 264