ミニレビュー

[Nippon Nōgeikagaku Kaishi Vol. 71, No. 8, pp. 815~820, 1997]

スルホニール尿素受容体： ATP 感受性 K^+ チャネルのレギュレーター†

稲垣暢也，清野 進

(千葉大学医学部高次機能制御研究センター)

Key words : sulfonylurea receptor : ATP : inward rectifier : potassium channel

はじめに

スルホニール尿素 (SU) 剤は経口血糖降下剤として糖尿病治療に世界で最も広く用いられている薬剤である。その作用機序として、SU 剤が膵 β 細胞の ATP 感受性 K^+ チャネル (K_{ATP} チャネル) を閉鎖することによって細胞膜を脱分極させ、インスリン分泌をひきおこすことが知られていたが、その分子基盤は最近まで全く不明であった。最近、SU 剤に高親和性の蛋白質 (スルホニール尿素受容体：SUR) が単離され、SUR が ABC スーパーファミリーに属することが明らかになった。筆者らは、 K_{ATP} チャネルが SUR と内向き整流性 K^+ チャネル (Kir) ファミリーに属する蛋白質との複合体であることを明らかにした。すなわち、 K_{ATP} チャネルは SUR サブユニットと Kir サブユニットの両者が存在して初めて機能し、チャネルの ATP や SU 剤による開閉は SUR サブユニットにより調節されている。ABC トランスポーターがチャネルのレギュレーターとして機能することを示したこの結果は、イオンチャネルやトランスポーターの分野に新たな概念をもたらすことになった。

膵 β 細胞のスルホニール尿素受容体と K_{ATP} チャネル

K_{ATP} チャネルは、細胞内の ATP により濃度依存性

に閉鎖するもので、1983 年に初めて心筋細胞において報告された。このチャネルはその後、膵 β 細胞、神経細胞、骨格筋や血管平滑筋などにおいてもその存在が報告された⁽¹⁾。

膵 β 細胞の静止膜電位は主にこの K_{ATP} チャネルによって維持されていると考えられている^(1,2)。膵 β 細胞の K_{ATP} チャネルは弱い内向き整流性を示し、内向きの単一チャネルコンダクタンスは約 70 pS である。図 1 に示すように、血中グルコース濃度を刺激濃度以下から刺激濃度 (>5.5 mM) に上昇させると、グルコーストランスポーターを介して膵 β 細胞内に取り込まれたグルコースが代謝されて ATP 産生が増加し、細胞内 ATP/ADP 比が上昇する。その結果、 K_{ATP} チャネルが閉鎖し、細胞膜は K^+ の透過性を維持できなくなり、膜電位

図 1 現在考えられているグルコース刺激による膵 β 細胞のインスリン分泌のメカニズム

† The Sulfonylurea Receptor : The Regulator of ATP-Sensitive K^+ Channels

Nobuya INAGAKI and Susumu SEINO (Division of Molecular Medicine, Center for Biomedical Science, Chiba University School of Medicine)

は徐々に脱分極する。膜電位が電位依存性 Ca^{2+} チャネル (VDCC) の閾値 (約 -50 mV) に達すると VDCC は活性化され、活動電位の群れ (バースト) が出現する。この VDCC を介する Ca^{2+} の細胞外からの流入によりインスリンの開口放出が惹起されると考えられる。代表的な SU 剤であるトルブタミドやグリベンクラミドは ATP と同様に膵 β 細胞の K_{ATP} チャネルを抑制することによってインスリン分泌を刺激し、血糖を低下させる。また、血管拡張剤であるジアゾキサイドやピナシディールは膵 β 細胞の K_{ATP} チャネルを開口させることによりインスリン分泌を抑制し、血糖上昇作用を有する。

しかし、SU 剤が K_{ATP} チャネルに直接作用するのか、それとも SU 剤の結合蛋白質 (従来よりスルホニール尿素受容体と呼ばれてきた)^(3,4) を介して K_{ATP} チャネルに作用するのかその分子基盤は全く不明であった。

スルホニール尿素受容体 (SUR) の構造

スルホニール尿素受容体の生化学的特性については $[^3\text{H}]$ や $[^{125}\text{I}]$ で標識したグリベンクラミド、あるいはその誘導体をリガンドとして膵 β 細胞、膵 β 細胞由来の株細胞、脳の膜分画との結合実験により結合蛋白は $140\sim 150 \text{ kDa}$ と推定されていた⁽³⁾。またグリベンクラミドの結合特性については組織や細胞株の種類により Kd が $1\sim 10 \text{ nM}$ のもの (高親和性) と $100 \text{ nM}\sim \text{mM}$ オーダー (低親和性) の少なくとも 2 種類が存在することが示唆されていた⁽³⁾。最近、Aguilar-Bryan らはグリベンクラミドのアナログと結合する蛋白質を抽出・精製し、その一部のアミノ酸配列を決定することによって、スルホニール尿素受容体 (SUR) の cDNA の単離に成功した⁽⁵⁾。(現在では、SUR にイソフォームが存在することが明らかにされたため、当初同定された SUR は SUR 1 と名付けられている。) ハムスター SUR 1 は 1582 個のアミノ酸からなり細胞膜を 13 回貫通する構造を有すると考えられ、ABC スーパーファミリーに属することが明らかとなった。この SUR 1 は哺乳動物細胞に発現させた実験によりグリベンクラミドに高い親和性 ($\text{Kd} < 10 \text{ nM}$) を示す蛋白質であることが示された^(5,6)。ところが、この SUR 1 を動物細胞に単独で発現させてもチャネル電流は認められないことから、この時点では SUR 1 そのものが K_{ATP} チャネルではないことが示された。

内向き整流性 K^+ チャネルの単離

一方、 K_{ATP} チャネルは前述したように弱い内向き整流性を有するチャネルである。内向き整流性 K^+ チャネルの分子構造に関しては、最近まで全く不明であったが、1993 年、内向き整流性 K^+ チャネルの cDNA が発現クローニングの手法により Ho ら⁽⁷⁾ や、Kubo ら⁽⁸⁾ によって単離されたのがきっかけとなって、次々と分子構造が明らかにされた。単離された ROMK 1 (Kir 1.1)、IRK 1 (Kir 2.1) や GIRK 1 (Kir 3.1) などの内向き整流性 K^+ チャネルはすべて膜を 2 回貫通する構造 (M1, M2) をとり、 K^+ イオンの選択的透過に重要である H5 ドメインも認められた。現在では、ROMK 1、GIRK 1 や IRK 1 のイソフォームも単離され、内向き整流性 K^+ チャネルは一大ファミリーを形成されることが明らかになっている⁽⁹⁾。

Aguilar-Bryan らのグループがスルホニール尿素受容体の単離を試みている一方で、筆者らは、 K_{ATP} チャネルはこの内向き整流性 K^+ チャネル (Kir) ファミリーに属するものと推測し、膵ラ氏島や膵 β 細胞に発現する内向き整流性 K^+ チャネルの単離を試みている。その結果、最初に新たな内向き整流性 K^+ チャネル $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ を単離した⁽¹⁰⁾。 $\text{uK}_{\text{ATP}}-1$ は ROMK 1、IRK 1 や GIRK などと $30\sim 40\%$ のアミノ酸一致を有し、新たな内向き整流性 K^+ チャネルサブファミリー Kir 6.0 を構成するものと考えられ、Kir 6.1 と名付けられた。さらに筆者らは、Kir 6.1 と 71% のアミノ酸一致を有し同じく Kir 6.0 サブファミリーに属する、Kir 6.2 の cDNA を新たに単離した⁽¹¹⁾。ノザンプロット解析を行ったところ Kir 6.2 は膵島および膵 β 細胞株に最も強い発現が認められ、心筋、骨格筋、脳にも発現が認められた⁽¹⁰⁾。そこで、Kir 6.2 が K_{ATP} チャネルであると期待し、Kir 6.2 を動物細胞に発現させチャネル機能の解析を行ったが、Kir 6.2 を単独に発現させてもチャネル電流は認められなかった。

K_{ATP} チャネルの機能発現

SUR 1 の発現をノザンプロット法によって解析したところ、膵島や膵 β 細胞株に最も強い発現が認められた⁽¹¹⁾。このノザンプロットの結果は膵 β 細胞に Kir 6.2 と SUR 1 が共発現していることを示している。そこで、Kir 6.2 と SUR 1 の cDNA を同時に COS 1 細胞に発現させてみた。その結果、チャネルコンダクタンスが約 76 pS の内向き整流性の K^+ チャネル電流がパッチク

図 2 COS 1 細胞に SUR 1 と Kir 6.2 (臍 β 細胞型 SUR 1/Kir 6.2 チャンネル) あるいは SUR 2 と Kir 6.2 (骨格筋・心筋型 SUR 2/Kir 6.2 チャンネル) を共発現させたときに生じるチャンネル電流のパッチクランプ法を用いた機能解析。

A. 膜電位を -80 mV $\sim$ $+80$ mV に固定したときにチャンネルを流れる電流の電圧電流特性。(細胞内・外の K^+ 濃度を 140 mM に、細胞外の Mg 濃度を 2 mM とした) (文献 12 より改変引用)

B. ATP によるチャンネル電流抑制効果の用量依存曲線。(文献 12 より改変引用)

C. 臍 β 細胞型 SUR 1/Kir 6.2 チャンネル電流に及ぼすグリベンクラミドおよびジアゾキシドの効果 (文献 11 より改変引用)

D. 臍 β 細胞型 SUR 1/Kir 6.2 チャンネル電流と骨格筋・心筋型 SUR 2/Kir 6.2 チャンネルに及ぼすグリベンクラミドの効果の用量依存曲線。SUR 1/Kir 6.2 チャンネルあるいは、SUR 2/Kir 6.2 チャンネルを発現させた COS 1 細胞の $^{86}\text{Rb}^+$ efflux に及ぼすグリベンクラミドの効果の用量依存曲線を示した。(文献 12 より改変引用)

ランプ法にて認められた (図 2 A)。さらに、このチャンネル電流は ATP によって用量依存的に抑制され、 K_i 値は約 10 μ M であった (図 2 B)。従って、Kir 6.2 と SUR 1 の共発現によって再構成系で得られた K^+ チャンネル電流は ATP 感受性であることが明らかとなった⁽¹¹⁾。次に、この ATP 感受性 K^+ チャンネル電流に及ぼす薬剤の影響について検討を加えた。代表的な SU 剤であるグリベンクラミドはチャンネル電流を抑制し (図 2 C)、細胞からの K^+ イオンの流出を $^{86}\text{Rb}^+$ をトレーサーとして観察した $^{86}\text{Rb}^+$ efflux で検討したところ、その K_i 値は約 8 nM であった⁽¹²⁾。一方、臍 β 細胞の K_{ATP} チャンネルのオープナーであるジアゾキシドによってこの K^+ チ

ャンネル電流の活性化が認められた (図 2 C)⁽²⁴⁾。これらの電気生理学的、薬理学的特性は臍 β 細胞の K_{ATP} チャンネルのそれとほぼ一致した。

以上の結果から、臍 β 細胞の K_{ATP} チャンネルは ABC スーパーファミリーの SUR 1 と内向整流性 K^+ チャンネル (Kir) ファミリーの Kir 6.2 の少なくとも 2 種類のサブユニットからなる複合体であることが初めて明らかになった (図 3)⁽²⁵⁾。

SUR ファミリー

K_{ATP} チャンネルは臍 β 細胞の他にも神経細胞、心筋や骨格筋、血管平滑筋などにおいてもその存在が報告されている。しかし、ノザン解析の結果、心筋や骨格筋

図 3 K_{ATP} チャンネルの構造モデル。膵 β 細胞の K_{ATP} チャンネルは Kir 6.2 と SUR 1 の、心筋・骨格筋の K_{ATP} チャンネルは Kir 6.2 と SUR 2 の 2 種類のサブユニットからなる複合体であることが明らかとなった。内向きは整流性 K^+ チャンネル (Kir) ファミリーに属する Kir 6.2 は細胞膜を 2 回貫通する構造をとると考えられ、 K^+ のイオン選択的透過に重要なドメインを有する。一方、ABC スーパーファミリーに属する SUR は細胞膜を 13 回貫通する構造をとると考えられている。Kir 6.2 や SUR それ単独ではチャンネル活性を有さないが、両者を同時に発現させると膵 β 細胞や骨格筋・心筋の K_{ATP} チャンネル特性を持つチャンネル活性が認められるようになる。Kir 6.2 と SUR の共発現によって認められる K_{ATP} チャンネルの SU 剤や ATP に対する感受性は SUR サブユニットが決定していると考えられる。

には Kir 6.2 が発現しているにもかかわらず SUR 1 の発現は認められなかった。従って、これらの組織には異なる SUR のイソフォームが発現していると予想された。最近、筆者らはラットの SUR 2 は 1545 個のアミノ酸からなり、SUR 1 と 68% のアミノ酸一致を有する SUR 1 のイソフォーム、SUR 2 の cDNA を新たに単離した⁽¹²⁾。この結果は、SUR がファミリーを形成していることを示している。SUR 2 mRNA は、心筋、骨格筋や卵巣に強く発現が認められるほか、脳や膵島にも中等度の発現が、消化管や、精巣、副腎などに弱い発現が認められた。SUR 2 を Kir 6.2 と共発現させたところ、心筋や骨格筋の K_{ATP} チャンネルの薬理学的特性と良く一致したチャンネル電流が認められた⁽¹²⁾。すなわち、ATP に対する感受性が低く、その K_i 値は約 100 μ M であった (図 2 B)。また、グリベンクラミドに対しても低親和性 ($K_d=0.63 \mu$ M) を示した⁽¹²⁾。さらに、膵 β 細胞の K_{ATP} チャンネルのオープナーであるジアゾキサイドには全く反応せず、心筋の K_{ATP} チャンネルのオープナーであるピナシジルやクロマカリムによって活性

化が認められた⁽¹²⁾。これらの結果は、SUR 2 と Kir 6.2 の共発現によって心筋・骨格筋型 K_{ATP} チャンネル電流を再構成できるということに加えて、 K_{ATP} チャンネルの ATP, SU 剤や K_{ATP} チャンネルオープナーに対する感受性が SUR ファミリーによって決定されることを示している。しかし、心筋・骨格筋型 (SUR 2/Kir 6.2) K_{ATP} チャンネル電流は膵 β 細胞型 (SUR 1/Kir 6.2) K_{ATP} チャンネル電流と、内向き整流性や単一チャンネルコンダクタンスがほぼ一致していることから (図 2 A)、これらの特性は両者に共通の Kir 6.2 サブユニットによって規定されているものと考えられる。さらに、最近では Isomoto らが、我々の単離した SUR 2 と C 末端のアミノ酸が 42 個だけ異なる variant form を単離し、我々の単離した SUR 2 を SUR 2 A、彼らが単離した variant form を SUR 2 B と命名している⁽¹³⁾。RT-PCR を用いた彼らの検討によれば、SUR 2 A は心筋、骨格筋のほか小脳、眼、膀胱に発現が認められ、SUR 2 B は様々な組織に ubiquitous に発現している。さらに、Isomoto らは SUR 2 B は Kir 6.1 と共発現させることにより血管平滑筋の K_{ATP} チャンネルが再構築できると報告している^(13,14)。筆者らも、現在 Kir 6.1 の細胞内局在や機能調節に関して詳細に検討しており、今後 Kir 6.1 の生理的役割をも含めて、 K_{ATP} チャンネルの機能的多様性が分子レベルでさらに明らかにされるものと思われる。

K_{ATP} チャンネル遺伝子とその異常

ヒト SUR 1 遺伝子と Kir 6.2 遺伝子は第 11 染色体 p 15.1 の位置に隣接して存在し、その間の距離はわずかに 4.5 kb であることが明らかになった^(5,11)。また、ヒト SUR 2 遺伝子は第 12 染色体 p 12.1 に存在し⁽¹⁵⁾、ヒト第 12 染色体 p 11.23⁽¹⁶⁾ に存在する Kir 6.1 遺伝子の近傍に存在する。これらのことは、 K_{ATP} チャンネルの進化を考えるうえで興味深い。

膵 β 細胞の K_{ATP} チャンネルはグルコースによるインスリン分泌を調節する極めて重要な分子であるので、 K_{ATP} チャンネルを構成する SUR 1 あるいは Kir 6.2 の遺伝子異常はインスリン分泌障害をきたし、血糖の異常の原因となることが予想される。ヒト SUR 1 遺伝子の蛋白翻訳領域は 39 個のエクソンから構成され、一方ヒト Kir 6.2 遺伝子の蛋白翻訳領域にはイントロンが存在せず 1 個のエクソンから構成される。現在までに家族性低血糖症 (persistent hyperinsulinemic hypoglycemia

図 4 予想される K_{ATP} チャネルの stoichiometry. K_{ATP} チャネルは Kir 6.0 サブファミリーに属する Kir サブユニットの 4 量体が K^+ イオンは透過するポアを形成し、さらにその周囲を 4 つの SUR サブユニットが取り囲む、octamer 構造であると予想される。

of infancy ; PHHI) の患者の数家系で SUR 1 遺伝子の異常、1 家系において Kir 6.2 の遺伝子異常が報告されている⁽¹⁷⁻²⁰⁾。これらの遺伝子異常によって、 K_{ATP} チャネルは機能せずに閉鎖し続け、その結果膵 β 細胞の脱分極が持続的に起こるために、絶えず Ca^{2+} が細胞内に流入し、低血糖状態においても持続的にインスリンを分泌し続けることによって、重篤な低血糖をきたすものと考えられる⁽²¹⁾。

おわりに

このように K_{ATP} チャネルの構造が明らかにされたが、その結果は同時にイオンチャネルのファミリーと ABC トランスポータのファミリーが複合体を形成していることを分子レベルで初めて報告したものである。現在筆者らは、図 4 に示すように K_{ATP} チャネルは Kir 6.0 サブファミリーに属するサブユニットの 4 量体が K^+ イオンを透過するポアを形成し、さらにその周囲を 4 つの SUR サブユニットが取り囲む、hetero-octamer 構造をとると推測している⁽²²⁾。今後、X 線解析などの手法を用いることによって、その構造の詳細が明らかになるであろう。

ABC スーパーファミリーに属する MDR や MRP は抗癌剤などの薬剤を細胞外に排出するポンプであり、細胞の薬剤耐性獲得に極めて重要な役割を果たしている。また、CFTR はそれ単独で Cl^- イオンのチャネルとして機能しうる。cMOAT はビリルビンの胆汁中への排出に関与し、その異常によって先天性黄疸を来しうることが報告されている。アミノ酸配列が cMOAT に最も類似する SUR はチャネルレギュレーターとしての役

割の他にもそれ単独で何らかの機能を有している可能性も否定できない。また、従来より CFTR は外向き整流性 Cl^- チャネルと MDR は volume-activated Cl^- チャネルとの関連が示唆されている⁽²³⁾。 K_{ATP} チャネルの構造モデルは、他のイオンチャネルや ABC スーパーファミリーに新たなパラダイムをもたらすかもしれない⁽²⁴⁾。

- (1) F. M. Ashcroft : *Ann. Rev. Neurosci.*, **11**, pp.97-118 (1988).
- (2) 稲垣暢也, 他 : 糖尿病学 1994 (診断と治療社, 小坂樹徳, 菊池方利編) pp.99-114 (1994).
- (3) S. J. H. Ashcroft and M. Ashcroft : *Biochim. Biophys. Acta.*, **1175**, pp.45-59 (1992).
- (4) 仁木一郎 : 糖尿病学 1994 (診断と治療社, 小坂樹徳, 菊池方利編) pp.125-137 (1994).
- (5) L. Aguilar-Bryan, et al. : *Science*, **268**, pp.423-426 (1995).
- (6) L. H. Philipson and D. F. Steiner : *Science*, **268**, pp.372-373 (1996).
- (7) K. Ho, et al. : *Nature*, **362**, pp.31-38 (1993).
- (8) Y. Kubo et al. : *Nature*, **362**, pp.127-133 (1993).
- (9) C. G. Nichols, et al. : *Annu. Rev. Physiol.*, **59**, pp.171-191 (1997).
- (10) N. Inagaki, et al. : *J. Biol. Chem.*, **270**, pp.5691-5694 (1995).
- (11) N. Inagaki, et al. : *Science*, **270**, pp.1166-1170 (1995).
- (12) N. Inagaki, et al. : *Neuron*, **16**, pp.1011-1017 (1996).
- (13) S. Isomoto, et al. : *J. Biol. Chem.*, **271**, pp.24321-24324 (1996).
- (14) M. Yamada, et al. : *J. Physiol.*, **199**, pp.715-718 (1997).
- (15) N. Inagaki, et al. : *Genomics*, **30**, pp.102-104 (1995).
- (16) W. A. Chutkow, et al. : *Diabetes*, **45**, pp.1439-1445 (1996).
- (17) B. Glaser, et al. : *Nature genet.*, **7**, pp.185-188 (1994).
- (18) P. M. Thomas, et al. : *Science*, **268**, pp.426-429 (1995).
- (19) C. G. Nichols, et al. : *Science*, **272**, pp.1785-1787 (1996).
- (20) P. M. Thomas, et al. : *Am. J. Genet.*, **59**, 5010-5018 (1996).
- (21) C. Kane et al. : *Nature Medicine*, **2**, pp.1344-1347 (1996).
- (22) N. Inagaki, et al. : *FEBS Lett.*, **409**, pp.232-236 (1997).
- (23) C. F. Higgins : *Cell*, **82**, pp.693-696 (1995).
- (24) L. H. Philipson : *Science*, **270**, pp.1159 (1995).
- (25) S. Seino et al. : *Diabetes Rev.*, **4**, pp.177-190 (1996).