氏　　名(本籍)	清水健太郎　(東京都)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第424号
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当
学位授与年月日	平成14年12月11日
学位論文題目	Potentiation of slow component of delayed rectifier K^+ current by cGMP *via* two distinct mechanisms: inhibition of phosphodiesterase 3 and activation of protein kinase G **(細胞内cGMPによる心筋緩徐活性型遅延整流性K^+電流の増大：ホスホジエステラーゼ3の阻害とプロテインキナーゼGの活性化の関与)**

審査委員　主査　教授　三ツ浪　健　一
　　　　　副査　教授　浅　井　　徹
　　　　　副査　教授　堀　池　喜八郎

論文内容要旨

【目　的】

心筋細胞の遅延整流性K^+チャネル (I_K) は細胞膜の脱分極により活性化され、活動電位の再分極を促進する生理的に重要なイオンチャネルである。さらに洞房結節細胞では、I_K の脱活性化は拡張期緩徐脱分極相 (ペースメーカ電位) の形成に関わっており、自発性活動電位 (自動能) の発生に重要な働きをなす。ヒトを含む数種類のほ乳類の心筋細胞において I_K は速い活性化動態を示す急速活性型 (I_{Kr}) と、比較的遅く活性化する緩徐活性型 (I_{Ks}) の二つの成分から構成されていることが明らかにされている。I_{Ks} 蛋白はイオン透過孔をもつメインサブユニット (KvLQT1) とその機能を修飾する調節サブユニット (minK) との複合体であり、これらのサブユニットはそれぞれ*KCNQ1* 遺伝子および *KCNE1* 遺伝子によりコードされていることが示されている。さらにこれらの遺伝子の変異は I_{Ks} の機能障害をもたらし、活動電位持続時間 (心電図上QT時間に相当) の延長やtorsade de pointes型心室頻拍を引き起こし、遺伝性QT延長症候群 (LQTS) の病態 (失神や急死) の背景にあることが報告されている。

細胞内 cyclic GMP (cGMP) は、可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) や膜結合型グアニル酸シクラーゼ (pGC) の活性化によりGTPから産生され、種々のイオンチャネル機能を修飾することが知られている。これまで心筋細胞におけるcGMPによるイオンチャネルの修飾は主にCa^{2+}チャネルにおいて検討されてきたが、その作用は動物種や発達段階、さらには心臓の部位により異なっていることが明らかにされた。今回、申請者はモルモット単離洞房結節細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用して、細胞内cGMPによる I_{Ks} の修飾ならびにその背景にある細胞内機構について検討を行った。

【方　法】

５～８週齢雌性モルモットにsodium pentobarbitoneの腹腔内過剰投与を行い、心臓を摘出した。酵素処理により洞房結節領域から細胞を単離した。これらの単離洞房結節細胞に全細胞型パッチクランプを適用して I_{Ks} 電流を記録した。このときNa^+チャネルは膜電位を－50mVに保持することによって不活性化した。Ca^{2+}チャネルおよび I_{Kr} はnisoldipine(0.4 μM)およびE-4031(5 μM)によりブロックした。

【結　果】

細胞内cGMPの効果を調べるために電極内液にcGMP(100 μM)を加え、＋30mVのテスト電位で活性化された I_{Ks} の時間経過を調べた。I_{Ks} の活性化の程度は －50ｍＶに戻したときに誘発される末尾電流 (tail current) の大きさで調べた。末尾電流の値は経時的に増加し、cGMP負荷後10～15分で最

大反応（137±39%）が得られた。末尾電流の大きさからBoltzmannの式を用いて計算した半最大活性化電位（$V_{½}$）は負の方向へ6.7mVシフトした。ANP（100nM）を細胞外より投与しても、I_{Ks}の末尾電流は増加した（47.7±4.8%）。

細胞内cGMPによるI_{Ks}の増大作用にホスホジエステラーゼ（PDE）ならびにPKGの関与について検討した。

PDE3の選択的阻害薬であるmilrinone（100μM）を細胞外より投与すると、I_{Ks}の末尾電流は増加し（50.4±8.5%）、$V_{1/2}$は負の方向へ6.8mVシフトした。続けてすべてのPDEサブタイプに対する非選択的阻害薬として知られているIBMXを細胞外より投与すると、I_{Ks}の末尾電流は付加的に増加し、$V_{1/2}$もさらに負の方向へシフトした。

次に、プロテイン・キナーゼG（ＰＫＧ）を活性化する一方でPDEには作用の少ない物質として知られている8Br-cGMP(100μM)を細胞外より投与したところ、I_{Ks}の末尾電流は増加し（47.7±10.5%）、$V_{1/2}$は負の方向へ3.8mVシフトした。この増加はIBMX存在下でもみられたが、PKGの阻害薬であるKT-5823(500nM)を投与するとI_{Ks}はほぼ完全に消失した。さらに、IBMXによりI_{Ks}を増加させた後にプロテイン・キナーゼA(PKA)の選択的阻害薬のRp-8-Br-cAMPS(200μM)を投与したところの末尾電流は約80%減少し、続けて投与したKT-5823はI_{Ks}の末尾電流をさらに減少させた。

【考　察】

以上より、モルモット洞房結節細胞においてadenylyl cyclaseにはbasal activityが存在することが示唆され、さらにはPDE3が優位ではあるが他のサブタイプのPDEも存在し、I_{Ks}の調節に深く関わっているものと考えられた。またそれらPKAの活性化に加えて、PKGの活性化によってもI_{Ks}が調節されているものと考えられた。これらの結果よりモルモット心筋の洞房結節細胞においてI_{Ks}は、cAMPとcGMP、さらにはPKAとPKGが互いに関わりあった調節がなされているものと推察された。そしてI_{Ks}は、ペースメーカー電位に関わる電流の中で定常状態下での電気的自動能を維持する上で非常に重要な役割を果たしている電流の一つであると考えられた。

【結　論】

モルモット洞房結節細胞において、細胞内cGMPはI_{Ks}の調節に深く関わり、その細胞内機構としてはPDE3の阻害によるPKAの活性化のみならず、PKGの活性化によってもI_{Ks}を増強させると考えられた。

学 位 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ほ乳類心筋細胞に広く分布する緩徐活性型遅延整流性K^+チャネル（I_{Ks}）は活動電位の再分極過程を制御する重要な電流系であり、種々の神経伝達物質やホルモンもしくは細胞内物質の調節を受けている。本研究は細胞内cGMPによるI_{Ks}の調節機構についてモルモット洞房結節細胞に全細胞型パッチクランプ法を適用して検討を行い、以下の点を明らかにした。

1) 電極内に負荷したcGMPや細胞外に投与したANPはI_{Ks}を増大させた。
2) 細胞内cGMPにより増大したI_{Ks}に対しmilrinoneは効果をおよぼさなかった。
3) PKGの特異的活性化剤である8-Br-cGMPもI_{Ks}を増大させた。

以上より細胞内cGMPはI_{Ks}に対し増大作用をおよぼし、それにはPDE3抑制に伴うcAMP-PKA系の活性化およびPKGの活性化が関与することが明らかになった。このように本論文はI_{Ks}の細胞内調節機構について重要な知見を与えたものであり、博士（医学）の学位論文に値するものである。

なお、本学位授与申請者は平成14年11月28日実施の研究発表とその関連の試問を受け、合格と認められたものである。