

## 論文要旨

### Verrucotoxin inhibits $K_{ATP}$ channels in cardiac myocytes through a muscarinic $M_3$ receptor- $PKC$ pathway

〔ベルコトキシンは  $M_3$  型ムスカリン受容体- $PKC$  系を介して  
心筋  $ATP$  感受性  $K$  電流を抑制する〕

王 建 武

#### 【序論および目的】

オニダルマオコゼは蛋白毒(verrucotoxin; VTX)を刺棘に持つ。この魚に刺されるとその毒が痛みなどの局所障害をもたらし、時には、呼吸困難、心筋障害、痙攣などの全身症状を起こし、最悪の場合、死に至ることがある。その作用機序の1つとして  $K_{ATP}$  電流の活性化を示唆する報告があるが、未だ細密な検討はされていない。我々はこの機序を明らかにするため、モルモット単離心室筋細胞に膜電位固定(ホールセルクランプ)法を用いて、VTX の  $K_{ATP}$  電流に対する作用を検討した。

#### 【材料および方法】

- 1) モルモット心臓にコラゲナーゼ処理を行い、単離心室筋細胞を得た。この細胞に膜電位固定(ホールセルクランプ)法を適用し、 $K_{ATP}$  電流を記録した。
- 2) 細胞外液は Tyrode solution であり、電極内液(mM)は: 120 KOH, 120 glutamic acid, 25 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, 10 HEPES, 0.1 MgATP, pH 7.2 である。
- 3) カルシウム電流はカルシウムチャンネル遮断薬であるニソルジピンを用いて、また細胞内カルシウム増加により活性化するカリウムチャンネルは、電極内に EGTA を用いることより、おのおの抑制した。

#### 【結 果】

- 1) VTX は  $K_{ATP}$  電流を用量依存的に抑制した( $IC_{50}$  は 16.3  $\mu\text{g/ml}$ )。
- 2)  $\alpha_1$  型 adrenoceptor 拮抗薬 (10  $\mu\text{M}$  prazosin) 及びアデノシン受容体拮抗薬 (10  $\mu\text{M}$  8-(p-sulfophenyl) theophylline) は VTX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) の  $K_{ATP}$  電流抑制作用に影響を与えなかった。
- 3) ムスカリン受容体 agonist (carbachol 10  $\mu\text{M}$ ) は  $K_{ATP}$  電流を抑制するが、この条件で VTX (10  $\mu\text{g/ml}$ ) の  $K_{ATP}$  電流抑制作用は著しく減弱した。

- 4) 非特異的ムスカリン受容体拮抗薬 (1  $\mu$ M atropine)及び M<sub>3</sub>型ムスカリン受容体拮抗薬 (100 nM 4-DAMP)存在下で、VTX(10  $\mu$ g/ml)の K<sub>ATP</sub> 電流抑制効果は著しく減弱した。
- 5) PKA 阻害薬 (0.5 $\mu$ M H-89)存在下で、VTX (10  $\mu$ g/ml)の K<sub>ATP</sub> 電流抑制作用は変化しなかった。
- 6) PKC 阻害薬 (0.6 $\mu$ M staurosporine、10  $\mu$ M chelerythrine 及び 10  $\mu$ M calphostin C)存在下で、VTX (10  $\mu$ g/ml)の K<sub>ATP</sub> 電流抑制効果は著しく減弱した。

**【結論及び考察】**

本研究において、VTX が用量依存的に心筋 K<sub>ATP</sub> 電流を抑制することが明らかになった。この効果はムスカリン受容体刺激や M<sub>3</sub>型ムスカリン受容体のブロックによって著しく減弱するこから、M<sub>3</sub>型ムスカリン受容体を介していると考えられる。更に、VTX 効果は PKC 阻害薬でも抑制されることから、M<sub>3</sub>型ムスカリン受容体→PKC 活性化→K<sub>ATP</sub> チャンネルリン酸化→チャンネル抑制の機序が推定される。K<sub>ATP</sub> チャンネルは心筋虚血時に開口して、心保護的に働くことが知られているので、VTX の K<sub>ATP</sub> 電流抑制は VTX による心筋障害の主要な一機序であると思われる。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 12 号	学位申請者	王 建武
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位 博士 (医学)
	副査	原田 秀逸	副査 上村 裕一
	副査	堀内 正久	副査 長堂 竜維

### Verrucotoxin inhibits $K_{ATP}$ channels in cardiac myocytes through a muscarinic $M_3$ receptor-PKC pathway

(ベルコトキシンは  $M_3$  型ムスカリン受容体-PKC 系を介して

心筋 ATP 感受性 K 電流を抑制する)

European Journal of Pharmacology 2007, 予定

Verrucotoxin (VTX)は、奄美諸島以南の海域に生息するオニダルマオコゼ(学名 *Synanceia verrucosa*、英語名 reef stone fish)の毒の主成分で、蛋白質である。毒は背ビレの棘に存在し、その刺傷により激しい痛み、痙攣や麻痺、呼吸困難、低血圧を引き起こし、重症例は循環虚脱から死亡することがある。VTX の心筋イオンチャネルへの作用については数件の報告があり、その中に、カエル心筋の ATP 感受性 K チャネル ( $K_{ATP}$  チャネル) を修飾するという報告があるが、その機序は不明であった。本研究は、VTX が心筋  $K_{ATP}$  チャネルに及ぼす作用とその機序について、モルモット心筋にパッチクランプ法を適用して検討したものである。

心筋細胞において、 $K_{ATP}$  チャネルは通常閉じているが、VTX は同チャネルを直接開口させることはなかった。逆に K チャネル開口薬 pinacidil によって開口させた  $K_{ATP}$  チャネルを抑制した。その作用は濃度依存的で、50%抑制濃度は 16  $\mu\text{g/ml}$  であった。VTX の作用はムスカリン受容体遮断薬 atropine や 4-DAMP ( $M_3$  サブタイプ特異的阻害薬)により遮断された。さらに、VTX 作用は、C キナーゼ阻害薬 chelerythrine や calphostin C により抑制されたが、A キナーゼ阻害薬 H-89 では抑制されなかった。

以上の結果より、VTX は  $M_3$  ムスカリン受容体に結合して、C キナーゼを活性化し、それが  $K_{ATP}$  チャネルをリン酸化し、その結果チャネルが抑制されるものと推定している。

本研究は、VTX がムスカリン受容体に作用して心筋細胞内の C キナーゼが活性化されることを初めて報告したものであり、オコゼ毒による心筋障害の発症機序とその治療に関して、重要な知見を提供するものと考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 12 号	学位申請者	王 建武
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位
	副査	原田 秀逸	副査
	副査	堀内 正久	副査
			博士 (医学)
			上村 裕一
			長堂 竜維

主査および副査の5名は、平成19年2月21日、学位申請者王 建武君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) VTXは精製したものをを用いたのか、それとも粗毒か。またVTXの subunit をを用いた実験は行ったのか。

(回答) VTXは部分精製品を用いた。同標品を電気泳動法で検討すると $\alpha$ 、 $\beta$ のサブユニットが確認され、精製度は40%程度であった。更に精製すると作用が無くなるという報告があったので、これ以上の精製はしなかった。また、各サブユニットを用いた実験は行っていない。

質問2) VTXはATP sensitive K currents ( $I_{KATP}$ )に対して不可逆的に作用するのか。Wash outによる回復はどの程度か。

(回答) VTXの効果は可逆的と考えられるが、wash outによる回復は遅く、20-30分で抑制量の60%程度分が回復するという経過である。

質問3) 用量反応曲線を作成する時はVTXの濃度を順に上昇させる連続投与をおこなったのか。それとも標本を変えて、各濃度1回だけVTXの $I_{KATP}$ に対する作用を検討したのか。

(回答) 1つの細胞に1つの濃度のVTXを投与した。

質問4) モルモットとカエルでVTXの $I_{KATP}$ に対する作用が異なるが、これは種による差か。

(回答) カエルを用いてVTXの作用を検討した報告は、電流の直接測定ではなく活動電位に対する作用の検討なので、我々の実験方法とは異なる。しかし、種差がある可能性は否定できない。

質問5) モルモットの心室筋を実験に用いた理由は何か。

(回答)  $I_{KATP}$ の研究に関してモルモットの心室筋がよく用いられているからである。

質問6) 他の魚の毒素も $I_{KATP}$ を調節するのか。

(回答) 知る限り、その様な報告はない。今後、検討してみたい。

質問7) VTXの細胞内情報伝達系を検討する実験でstaurosporineとpinacidilの投与の順番を変えた場合、実験結果に影響を与えるのではないのか。

(回答) Pinacidilは $K_{ATP}$ チャンネルに直接作用し、staurosporineはCキナーゼの阻害剤なので、投与の順番を変えても実験結果には大きな影響はないと考えた。

質問8) 論文の中で、background currentsの事をいっているが、これは何を意味するのか。

(回答) 内向き整流性K電流 (inward rectifier K currents) の事である。

## 最終試験の結果の要旨

質問 9)  $I_{KATP}$  は run-down するのか。

(回答)  $I_{KATP}$  は run-down するが、この実験条件においては 20 分程度では run-down しない。

質問 10) VTX は、蛋白としてどのような性質を持っているか。

(回答) VTX は、 $\alpha_2\beta_2$  の 4 量体からなる分子量約 32 万の蛋白質である。アミノ酸配列が部分的にし  
か判明していないので、詳細は不明である。

質問 11) Pinacidil 非存在下では、VTX の  $I_{KATP}$  に対する作用があるか。

(回答) Pinacidil 非存在下では  $I_{KATP}$  は殆ど観察されないので、VTX 効果は判定できない。

質問 12) VTX の  $M_3$  受容体に対する作用は直接作用なのか間接的作用なのか。

(回答)  $M_3$  アンタゴニストにより阻害されるので、直接作用と考えるが、最終的結論には結合実験  
が必要であると考えられる。

質問 13) 実験に使用した薬物の濃度はどのようにして決めたのか。

(回答) 文献で各薬物の  $IC_{50}$  を参照して、使用する濃度を決定した。

質問 14) 痛み、呼吸障害、痙攣および心筋障害が VTX により引き起こされるが、それらの機序はこ  
の実験結果によりすべてが説明できるのか。

(回答) 心筋障害については、心筋保護に働く  $I_{KATP}$  を VTX が抑制することから説明できるが、それ  
以外については、説明は難しい。さらなる研究が必要である。

質問 15) 実験では  $\mu\text{g/ml}$  で濃度を示しているが、モル濃度で考えるとどれくらいなのか。

(回答) VTX の分子量は約 32 万なので、実験で用いた  $10 \mu\text{g/ml}$  は精製純度により 15-30 nM に相当  
する。

質問 16) Atropine 等のブロッカーにより VTX 作用が抑制されるが、VTX はリガンドと競合的に作  
用しているのか、あるいはアロステリック的に作用しているのか。

(回答) 結合実験を行っていないので不明である。今後、検討したい。

質問 17) Pinacidil 投与により  $I_{KATP}$  は活性化される際に、その電流量にばらつきがあるが、それは  
何故か。

(回答) 細胞の大きさが均一でない事が第一の原因と考えられる。また、細胞を単離してから各々  
の細胞が実験に使われるまでの時間が異なるので、 $I_{KATP}$  にばらつきが生じた可能性も考えられる。  
しかし、電流量のばらつきは、結論には影響しないと考えている。

質問 18) VTX の作用機序の 1 つとして受容体を介して  $I_{KATP}$  を修飾することは判ったが、それ以外  
に何か明らかになった事はないのか。

(回答)  $\beta$  アドレナリン受容体を介して Ca チャネルを修飾する作用を我々は発見している。VTX  
は、神経症状や呼吸障害を起こすが、それらの作用の分子機構については、不明である。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有  
しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。