

遺伝子欠損マウスを用いた

心筋虚血耐性獲得の分子機構の解明

(研究課題番号 13670080)

平成 13～平成 14 年度科学研究費補助金

(基盤研究 (C)(2))

研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 中谷晴昭

(千葉大学大学院医学研究院教授)

## はしがき

20 年前に野間によって発見された ATP 感受性  $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャネルの生体における役割に関する研究はこの 5 年で大きく進歩した。その背景には本学の清野教授のグループによって  $K_{ATP}$  チャネルのポア成分 Kir6.x の分子構造が明らかにされ、それらの遺伝子欠損マウスが作成されたことによる。今までの研究により、心筋細胞膜の  $K_{ATP}$  チャネルのポア成分は Kir6.2 からなることを既に明らかにしてきたが、本研究はそれらの遺伝子欠損マウスを用い、心血管系における  $K_{ATP}$  チャネルの病態生理的役割を明らかにしようとしたものである。

心筋に短時間の虚血負荷を与えるとその後の冠動脈閉塞による心筋梗塞巣が減少する“ischemic preconditioning”という現象が存在することを 1986 年 Murry らが報告して以来、多くの研究者が同様の現象を観察している。この内因性の虚血耐性獲得の機序として、従来から細胞膜  $K_{ATP}$  ( $sarcK_{ATP}$ ) チャネルの活性化が提唱されていた。すなわち、心筋細胞を低酸素状態におくと  $sarcK_{ATP}$  チャネルの活性化によって活動電位幅が短縮し、その結果プラトー相での  $Ca^{2+}$  の細胞内への流入が減少して虚血による心筋障害が減少するという考え方である。事実、1980 年代に開発された  $sarcK_{ATP}$  チャネル活性化作用を持つ  $K^+$  チャネル開口薬は心筋梗塞巣を減少させる、いわゆる pharmacological preconditioning 作用を示すことも明らかとなった。しかしながら 1990 年後半になり、ミトコンドリアにもある種の  $K_{ATP}$  チャネル ( $mitoK_{ATP}$  チャネル) が存在し、その活性化が  $sarcK_{ATP}$  チャネルの活性化より虚血心筋保護機構により重要であるとする意見が主流になりつつある。そこで本研究では心筋細胞の  $sarcK_{ATP}$  チャネルが欠損している Kir6.2 ノックアウトマウスを用い、内因性の虚血耐性が保たれているか否かを検討し、これによって  $sarcK_{ATP}$  チャネルの病態生理的役割を明らかにしようとした。また、まだ分子構造の明らかとなっていない  $mitoK_{ATP}$  チャネルの機能が Kir6.2 ノックアウトマウスの心筋細胞で保たれているか否かについても検討した。

得られた実験結果から、Kir6.2 ノックアウトマウスの心筋細胞では虚血類似

状態での活動電位幅短縮は認められなかったが、フラボプロテインの酸化反応で評価した mitoK<sub>ATP</sub> チャンネル機能は保たれていた。しかしながら野生型マウスで観察された ischemic preconditioning 現象は Kir6.2 ノックアウトマウスで完全に消失していた。また、Kir6.2 ノックアウトマウスの摘出灌流心では虚血・再灌流後の心機能の回復は野生型マウスの灌流心に比して悪かった。これらの結果から、sarcK<sub>ATP</sub> チャンネルは虚血心筋保護という観点から重要な役割を果たすと結論される。

それでは mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルはどのような役割を果たしているのでしょうか。非電気刺激下で静止状態にある単離ラットあるいはマウス心筋細胞において、ouabain で Ca<sup>2+</sup> 過負荷をおこし、それに対する mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの開口薬である diazoxide を与えるとミトコンドリア内の Ca<sup>2+</sup> 過負荷が軽減し、心筋細胞保護効果が観察された。また、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの遮断薬とされる 5-hydroxydecanoate (5HD) を与えると diazoxide の作用は消失した。このことから、確かに mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの活性化を介する心筋保護作用が存在すると思われるが、心拍数が非常に多いマウスでは sarcK<sub>ATP</sub> チャンネルの役割がより重要になると考えられる。

次に K<sub>ATP</sub> チャンネルのもう 1 つのポア成分である Kir6.1 の欠損した Kir6.1 ノックアウトマウスを用い、実験を行った。Kir6.1 ノックアウトマウスの心筋細胞では K<sup>+</sup> チャンネル開口薬によって外向き電流が活性化し、活動電位幅は短縮した。このことは Kir6.1 ノックアウトマウスの心筋細胞において sarcK<sub>ATP</sub> チャンネルの機能が保たれていることを示唆する。また、diazoxide によってもフラボプロテインの酸化反応がおき、mitoK<sub>ATP</sub> チャンネルの機能も保たれていることが示された。しかしながら、血管組織においては野生型あるいは Kir6.2 ノックアウトマウスのそれとは異なり、K<sup>+</sup> チャンネル開口薬によって弛緩反応が観察されなかった。また単離した Kir6.1 ノックアウトマウスの血管平滑筋細胞では、野生型あるいは Kir6.2 ノックアウトマウスの血管平滑筋細胞と異なり、K<sup>+</sup> チャンネル開口薬によって K<sub>ATP</sub> 電流は活性化しなかった。さらに興味深いことに、Kir6.1 ノックアウトマウスでは心臓突然死をおこし、その病因を詳細に検討す

ると Prinzmetal 型の狭心症が起きていることも明らかとなった。

mitoK<sub>ATP</sub> チャネルは機能的には存在するが、その分子構造は不明のままである。本研究によって Kir6.2 と Kir6.1 のうちのどちらもその構成成分でないことが示唆された。心筋細胞には Kir6.1 蛋白も多く存在することが明らかとなっているが、その生理的役割は不明である。今後心筋細胞における Kir6.1 の役割を明らかにするためにさらに研究を続ける予定である。

この冊子には本研究の成果のみならず、それに関連した研究の成果も含めてある。平成 13 年度から 14 年度にかけての科学研究費補助金としての研究助成に感謝したい。また、本研究を遂行するにあたって千葉大学大学院医学研究院細胞分子医学の清野進教授、三木隆司助教授には全面的な御協力を頂いた。これら二種類のノックアウトマウスの供給と適確なご助言を頂かなければ本研究は不可能であったと思われる。研究組織を代表して衷心より感謝の意を表したい。

## 研究組織

研究代表者 中谷晴昭（千葉大学・大学院医学研究院・教授）

研究分担者 佐藤俊明（千葉大学・大学院医学研究院・助教授）

## 交付決定額（配分類）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	2,100	0	2,100
平成14年度	2,000	0	2,000
総計	4,100	0	4,100

## 謝辞

本研究を遂行するにあたっては鈴木将博士、植村展子講師、玉川正次技官、  
霊園良恵技官に追うところが多く、また、大学院生の斎藤智亮君、三枝紀子医  
師、櫛田俊一医師、教務職員の坂下育美さんの御協力をもって行われたもので  
あり、ここに感謝の意を表します。

## 研究発表

### 学会誌等

### 英文原著論文

1. Ito, K., Sato, T. and Arita, M.: Protein kinase C isoform-dependent modulation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels during reoxygenation in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Physiol.*, 532: 165-174, 2001
2. Tanito, Y., Miwa, T., Endou, M., Hirose, Y., Gamoh, M., Nakaya, H. and Okumura F.: Interaction of edrophonium with muscarinic acetylcholine M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub> receptors. *Anesthesiology*, 94: 804-814, 2001
3. Suzuki, M., Li, R.A., Miki, T., Uemura, H., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Ogura, T., Seino, S., Marbán, E. and Nakaya H.: Functional roles of cardiac and vascular ATP-sensitive potassium channels clarified by Kir6.2-knockout mice. *Circ. Res.*, 88: 570-577, 2001
4. Kobayashi, S., Reien, Y., Ogura, T., Saito, T., Masuda, Y. and Nakaya, H.: Inhibitory effect of bepridil on hKv1.5 channel current: comparison with amiodarone and E-4031. *Eur. J. Pharmacol.* 430: 149-157, 2001
5. Ishida, H., Hirota, Y., Genka, C., Nakazawa, H., Nakaya, H and Sato, T.: Opening of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ. Res.*, 89: 856-858, 2001
6. Li, Y. and Sato, T.: Dual signaling via protein kinase C and phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt contributes to bradykinin B<sub>2</sub> receptor-induced cardioprotection in guinea pig hearts. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 33: 2047-2053, 2001

7. Suzuki, M., Sasaki, N., Miki, T., Sakamoto, N., Ohmoto-Sekine, Y., Tamagawa, M., Seino, S., Marbán, E. and Nakaya, H.: Role of sarcolemmal K<sub>ATP</sub> channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J. Clin. Invest.*, 109: 509-516, 2002
8. Furukawa, T., Ogura, T., Zheng, Y.-J., Tsuchiya, H., Nakaya, H., Katayama, Y. and Inagaki, N.: Phosphorylation and functional regulation of ClC-2 chloride channels expressed in *Xenopus* oocytes by M cyclin-dependent protein kinase. *J. Physiol.*, 540: 883-893, 2002
9. Ogura, T., Furukawa, T., Toyozaki, T., Yamada, K., Zheng, Y.-J., Katayama, Y., Nakaya, H. and Inagaki, N.: ClC-3B, a novel ClC-3 splicing variant that interacts with EBP50 and facilitates expression of CFTR-regulated ORCC. *FASEB J.*, 16: 863-865, 2002
10. Ishihara, M., Ogura, T., Akakura, K., Egoshi, K., Mikami, K., Nakaya, H. and Ito, H.: Cystine transport activity of heterozygous rBAT mutants expressed in *Xenopus* oocytes. *NEPHRON*, 91: 276-280, 2002
11. Miki, T., Suzuki, M., Shibasaki, T., Uemura, H., Sato, T., Yamaguchi, K., Koseki, H., Iwanaga, T., Nakaya, H., and Seino, S.: Mouse model of Prinzmetal angina by disruption of the inward rectifier Kir6.1. *Nature Med.*, 8: 466-472, 2002
12. Matsumoto, Y., Aihara, H., Yamauchi-Kohno, R., Reien, Y., Ogura, T., Yabana, H., Masuda, Y., Saito, T., Komuro, I. and Nakaya, H.: Long-term endothelin A receptor blockade inhibits electrical remodeling in cardiomyopathic hamsters. *Circulation*, 106: 613-619, 2002
13. Kushida, S., Ogura, T., Komuro, I. and Nakaya, H.: Inhibitory effect of the class III antiarrhythmic drug nifekalant on HERG channels: mode of action. *Eur. J. Pharmacol.*, 457: 19-27, 2002

14. Suzuki, M., Saito, T., Sato, T., Tamagawa, M., Miki, T., Seino, S. and Nakaya, H.: Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mice. *Circulation*, 107: 682-685, 2003

## 和文総説

1. 中谷晴昭: 心筋 K<sup>+</sup> チャネルと不整脈. 医学のあゆみ 循環器疾患 Ver 2 —*State of arts*—, 別冊: 40-42, 2001
2. 中谷晴昭, 清野進: 虚血・再灌流による心機能発現における細胞膜 ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャネルの役割 —Kir6.2 欠損マウスを用いた検討—. *臨床成人病*, 30: 1407-1408, 2001
3. 中谷晴昭: 薬剤誘発性 QT 延長症候群と創薬. *治療学*, 35: 24, 2001
4. 中谷晴昭, 小倉武彦, 渡邊泰秀, 霊園良恵, 滝沢太一, 小林智, 森勝巳, 原幸男, 玉川正次, 坂下育美, 植村展子: アミオダロンのマルチチャネル遮断作用とその電気薬理学的意義. *Progress in Medicine*, 21: 257-262, 2001
5. 中谷晴昭: イオンチャネル生理学からみた不整脈の成因. *総合臨床特集 ホルター心電図を読む*, 50: 664-670, 2001
6. 中谷晴昭: K<sup>+</sup> チャネルサブタイプ選択性. *カレントセラピー*, 19: 358, 2001
7. 中谷晴昭, 鈴木将, 植村展子, 佐藤俊明, 三木隆司, 清野進: 心臓の ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャネルとその役割. *生体の科学*, 53: 285-289, 2002
8. 中谷晴昭, 櫛田俊一, 小倉武彦: 抗不整脈薬の薬理学—分子レベルの作用—. *分子心血管病*, 3: 41-47, 2002
9. 中谷晴昭: 不整脈治療における upstream approach とその意義. *医学のあゆみ*, 200: 775-779, 2002
10. 中谷晴昭: 看護に役立つ薬理学の視点. *看護*, 54: 044-047, 2002



## 口頭発表

1. Nakaya, H.: The Kir6.2  $\pm$  mouse. K channel transgenesis in the mouse heart, 2001年5月31日～6月1日
2. 佐藤俊明, 石田英之, 中谷晴昭, 中澤博江: ミトコンドリア ATP 感受性  $K^+$  チャネル活性化によるミトコンドリアの脱分極と  $Ca^{2+}$  過負荷抑制. 第104回日本薬理学会関東部会, 2001年6月2日
3. 櫛田俊一, 小倉武彦, 小室一成, 中谷晴昭: HERG チャネルに対する III 群抗不整脈薬の抑制効果と脱活性化速度の関係について. 第12回循環基礎研究, 2001年9月8日
4. 佐藤俊明, 石田英之, 中澤博江, 中谷晴昭: ミトコンドリア ATP 感受性  $K^+$  チャネル活性化によるミトコンドリア内  $Ca^{2+}$  濃度と膜電位の変化. 第12回循環基礎研究会, 2001年9月8日
5. 中谷晴昭, 松本泰典, 相原肇, 山内理夏子, 小倉武彦, 矢花秀雄, 増田善昭, 小室一成: エンドセリン受容体遮断薬による不整脈の upstream 療法: 心筋症モデル動物を用いた研究. 第18回日本心電学会学術集会 シンポジウム「イオンチャネルのリモデリングと不整脈」, 2001年10月4日～5日
6. 中谷晴昭: 抗不整脈薬と標的イオンチャネル—より合理的な Sicilian Gambit の応用のために—. 第18回日本心電学会学術集会 ランチョンセミナー, 2001年10月4日～5日
7. 鈴木将, 植村展子, 中谷晴昭: 虚血再灌流障害に対する心筋保護効果発現には心筋細胞 ATP 感受性カリウムチャネルの存在が必須である. 第18回日本心電学会学術集会, 2001年10月4日～5日
8. 中谷晴昭: 抗不整脈薬の  $K^+$  チャネル遮断作用とその意義. 第32回県南不整脈研究会講演, 2001年11月1日

9. 櫛田俊一, 小倉武彦, 小室一成, 中谷晴昭: HERG チャネルの脱活性化速度によるⅢ群抗不整脈薬の作用の修飾. 第 105 回日本薬理学会関東部会, 2001 年 11 月 10 日
10. Suzuki, M., Nakaya, H., Miki, T., Seino, S., Sasaki, N., Marbán, E.: Role of sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury : evaluation using a Kir6.2 knockout mouse model. American Heart Association Scientific Sessions 2001, 2001 年 11 月 11 日～14 日
11. Sato, T., Ishida, H., Genka, C., Ban, K., Nakaya, H., Nakazawa, H.: Mitochondrial  $K_{ATP}$  channel openers, diazoxide and nicorandil, attenuate the mitochondrial  $Ca^{2+}$  overload in rat ventricular myocytes. American Heart Association Scientific Sessions 2001, 2001 年 11 月 11 日～14 日
12. 中谷晴昭:  $K^+$  チャネルと薬物. 第 31 回静岡薬物治療研究会講演, 2001 年 11 月 22 日
13. 中谷晴昭: 心筋  $K^+$  チャネルとニフェカラント—電気薬理学から見た抗不整脈薬としての位置付け—. ニフェカラント研究会世話人会, 2002 年 2 月 1 日
14. 佐藤俊明, 石田英之, 中澤博江, 中谷晴昭: ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネル活性化による心筋保護のメカニズム. 第 75 回日本薬理学会年会 シンポジウム「心筋虚血・再灌流障害におけるミトコンドリアの役割」, 2002 年 3 月 13 日～15 日
15. 鈴木将, 三木隆司, 清野進, 中谷晴昭: 虚血心筋保護における細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルの役割. 第 75 回日本薬理学会年会 シンポジウム「心筋虚血・再灌流障害におけるミトコンドリアの役割」, 2002 年 3 月 13 日～15 日

16. 中谷晴昭, 霊園良恵, 稲村直樹, 斉藤智充, 櫛田俊一, 小倉武彦:  
QT 延長薬物の細胞電気薬理学的評価法: 単離心筋細胞およびイオン  
チャンネル発現培養細胞での検討. 第 75 回日本薬理学会年会 シンポ  
ジウム「薬物誘発性 QT 延長症候群回避のための薬理学的戦略」,  
2002 年 3 月 13 日~15 日
17. 植村展子, 霊園良恵, 小倉武彦, 岸本充, 石倉浩, 中谷晴昭: HCN4 チャ  
ネル電流に対する抗不整脈薬の抑制作用とその電気薬理学的意義.  
第 75 回日本薬理学会年会, 2002 年 3 月 13 日~15 日
18. 中谷晴昭: 神経 Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> チャネル作用薬の薬理作用と臨床応用.  
エスエス製薬株式会社講演会, 2002 年 4 月 10 日
19. 原田高志, 遠藤正之, 植村展子, 中谷晴昭, 山田芳嗣: イソフルランの  
血管平滑筋弛緩作用の機序 —ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャネルの関与—.  
日本麻酔科学会第 49 回大会, 2002 年 4 月 18 日~20 日
20. Sato, T., Saito, T., Nakaya, H.: Minoxidil sulfate confers  
cardioprotection via activation of mitochondrial K<sub>ATP</sub> channels in  
guinea-pig ventricular myocytes. 第 66 回日本循環器学会総会・学術  
集会, 2002 年 4 月 24 日~26 日
21. Saito, T., Sato, T., Nakaya, H.: Ischemia-induced electrophysiological  
alterations in the heart of Kir6.2-deficient mice. 第 66 回日本循環器  
学会総会・学術集会, 2002 年 4 月 24 日~26 日
22. Kushida, S., Ogura, T., Nakaya, H.: Altered deactivation kinetics  
modify the inhibitory effects of class III antiarrhythmic drugs on  
HERG channel. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会,  
2002 年 4 月 24 日~26 日
23. Suzuki, M., Nakaya, H.: Cardioprotective effect of diazoxide is  
mediated by activation of sarcolemmal ATP-sensitive potassium  
channels in mouse model. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会,  
2002 年 4 月 24 日~26 日

24. 中谷晴昭: 心血管系の ATP 感受性  $K^+$  チャネルの機能分子とその病態生理的役割. 東京大学大学院薬学系研究科セミナー, 2002 年 6 月 4 日
25. 中谷晴昭: 新薬開発にける安全性評価: 心電図 QT 延長作用に関する電気生理学的評価とその意義について. 味の素株式会社講演会, 2002 年 6 月 12 日
26. 中谷晴昭: QT 延長薬物の細胞電気生理学的毒性評価: 単離心筋細胞および再構成系を用いた検討. 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会 セミナー「心電図異常、Q-Tc 間隔延長について」, 2002 年 6 月 18 日~20 日
27. 中谷晴昭: 心電図 QT 延長薬物の電気生理学的評価とその問題点. 三菱ウエルファーマ株式会社講演会, 2002 年 7 月 2 日
28. 佐藤俊明:  $K_{ATP}$  チャネルの構造と機能. 京都 K-ATP 研究会 特別講演, 2002 年 7 月 12 日
29. 17. 齊藤智亮, 佐藤俊明, 中谷晴昭, 三木隆司, 清野進: 虚血心筋の電気生理学的変化における ATP 感受性  $K^+$  チャネルの役割—Kir6.2 欠損マウスを用いた検討—. 第 25 回心筋代謝研究会, 2002 年 7 月 19 日~20 日
30. 中谷晴昭: ATP 感受性  $K^+$  チャネルに関する研究の新たな展開. 第 18 回信州・甲州・静岡循環セミナー講演, 2002 年 8 月 1 日~2 日
31. 中谷晴昭: からだと薬. 看護にいかす薬の基礎知識 講演, 2002 年 8 月 7 日
32. 中谷晴昭: からだと薬. 看護にいかす薬の基礎知識 講演, 2002 年 8 月 22 日
33. 中谷晴昭: 心血管系における  $K_{ATP}$  チャネルの役割—遺伝子欠損マウスから学んだこと新たな謎—. 第 17 回犬山カンファランス 講演, 2002 年 8 月 24 日

34. 22. 中谷晴昭, 鈴木将, 三木隆司, 清野進: 心血管系における ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャネルの役割—遺伝子ノックアウトマウスから学んだ事—  
第 6 回 Molecular Cardiovascular Conference 「イオンチャネル」  
講演, 2002 年 8 月 31 日～9 月 1 日
35. 三木隆司, 清野進, 鈴木将, 中谷晴昭, 岩永敏彦: 心血管系における Kir6.1 の役割. 第 19 回日本心電学会学術集会 パネルディスカッション「遺伝子工学による心筋イオンチャネル機能の解析と制御」,  
2002 年 9 月 9 日～10 日
36. 植村展子, 小倉武彦, 中谷晴昭: 心房—肺静脈系異所性自動能と HCN4 チャネル電流に対する抗不整脈薬の効果. 第 19 回日本心電学会学術集会, 2002 年 9 月 9 日～10 日
37. 齊藤智亮, 佐藤俊明, 三木隆司, 清野進, 中谷晴昭: ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャネル遺伝子 (Kir6.2) 欠損マウス心筋における虚血時の電気生理学的変化. 第 14 回循環器基礎研究会, 2002 年 9 月 14 日
38. 大塚正史, 赤澤宏, 鈴木将, 中谷晴昭, 小室一成: 虚血・再灌流障害における Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX) の作用—NCX ヘテロノックアウトマウスを用いた検討—. 第 14 回循環器基礎研究会, 2002 年 9 月 14 日
39. 中谷晴昭: 安全性薬理試験の最近の動向—QT 延長評価系について HERG 試験を中心に—. 大鵬薬品工業 講演, 2002 年 9 月 14 日
40. 小倉武彦, 古川哲史, 稲垣暢也, 中谷晴昭: PDZ 蛋白と結合する新しい Cl<sup>-</sup> チャネルの機能解析. 第 107 回日本薬理学会関東部会,  
2002 年 10 月 3 日
41. Nakaya, H., Ogura, T., Uemura, H., Reien, Y., Kishimoto, T., Isikura, H.: Pharmacological strategy for the prevention of atrial fibrillation. 第 19 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会 シンポジウム, 2002 年 10 月 31 日～11 月 1 日

42. Sato, T., Suzuki, M., Miki, T., Seino, S., Nakaya, H.: Diazoxide attenuates mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload in Kir6.1- and Kir6.2-deficient mouse ventricular myocytes. 第 19 回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会, 2002 年 10 月 31 日~11 月 1 日
43. Nakaya, H.: Role of sarcolemmal and mitochondrial  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channels in cardioprotection : Lessons from the  $\text{K}_{\text{ATP}}$  channel knockout mice. The Eighth International symposium on Adenosine, Cardioprotection and Its Clinical Application, 2002 年 11 月 16 日
44. Saito, T., Sato, T., Miki, T., Seino, S., Nakaya, H.: Comparative study of the ischemia-induced electrophysiological alterations between wild-type and Kir6.2-deficient mouse hearts. American Heart Association Scientific Sessions 2002, 2002 年 11 月 17 日~20 日
45. Ohtsuka, M., Akazawa, H., Suzuki, M., Nakaya, H., Wakimoto, K.: Role of  $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$  exchanger in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury: evaluation using a heterozygous NCX knockout mouse model. American Heart Association Scientific Sessions 2002, 2002 年 11 月 17 日~20 日
46. 櫛田俊一, 小倉武彦, 小室一成, 中谷晴昭: HERG チャネル脱活性化速度の変化による薬物作用の修飾. 平成 14 年度生理研研究会, 2002 年 11 月 25 日~26 日
47. 古川哲史, 鄭雅娟, 小倉武彦, 中谷晴昭, 稲垣暢也: 蛋白相互作用によるイオンチャネル調節機構. 平成 14 年度生理研研究会, 2002 年 11 月 25 日~26 日
48. 中谷晴昭, 鈴木将, 植村展子, 三木隆司, 清野進: 心血管系における ATP 感受性  $\text{K}^{+}$  チャネルの役割: 遺伝子改変動物を用いた解析. 第 12 回日本循環薬理学会 講演, 2002 年 11 月 28 日~29 日

49. 植村展子, 霊園良恵, 小倉武彦, 岸本充, 石倉浩, 中谷晴昭:  
 摘出左心房・肺静脈標本の興奮頻度と HCN4 チャネル電流に対する  
 抗不整脈薬の作用とその薬理学的意義. 第 12 回日本循環薬理学会,  
 2002 年 11 月 28 日～29 日
50. 中谷晴昭: 薬理学から見た不整脈薬物療法の展望—アミオダロンの新た  
 な電気薬理学的作用とその意義—. 第 2 回東北アミオダロン研究会  
 講演, 2002 年 11 月 30 日
51. 中谷晴昭: 不整脈薬物療法をめぐる新たな展開—Ⅲ群抗不整脈薬の電気  
 薬理学的作用とその意義—. 第 2 回つくば心臓セミナー 特別講演,  
 2002 年 12 月 6 日
52. 佐藤俊明: ミトコンドリア ATP 感受性 K チャネル. 第 1 回千葉循環器  
 フロンティア研究会 特別講演, 2002 年 12 月 1 日
53. 中谷晴昭: 薬理学から見た不整脈薬物療法の展望. 中国アミオダロン  
 研究会 講演, 2003 年 2 月 1 日
54. 中谷晴昭: QT 延長薬物の電気生理学的安全性評価の重要性と今後の  
 展望. 大正製薬医薬研究所講演会, 2003 年 2 月 21 日
55. 中谷晴昭: 第 2 回 ICHS7B に基づいた薬物誘発 QT 延長症候群の in vivo  
 評価法セミナー, 2003 年 3 月 15 日

## 出版物

1. 中谷晴昭, 小倉武彦: LQT とイオンチャネル. “薬物動態・作用と遺伝子  
 多型薬物治療の患者個別化を目指した 21 世紀の新展開” 澤田康文  
 編集 医薬ジャーナル社, pp. 400-410, 2001
2. 中谷晴昭: “臨床薬理学 シリーズ看護の基礎科学 第 7 巻 薬とのかか  
 わり” 中谷晴昭, 大橋京一 編集 日本看護協会出版会, 2001

3. 中谷晴昭, 鈴木将, 植村展子: ATP 感受性 K<sup>+</sup> チャンネル. “循環器フロンティアベーシック&クリニカルサイエンス” 小室一成 編集 メジカルビュー 東京, pp. 96-101, 2002
4. 佐藤俊明, 中谷晴昭: 抗不整脈薬と Ca<sup>2+</sup> 電流. “抗不整脈薬の新たな展開” 新博次 編集 医薬ジャーナル社 東京, pp. 63-71, 2002
5. 佐藤俊明, 中谷晴昭: K チャンネル遮断作用. “抗不整脈薬のすべて(第2版)” 小川聡, 大江透, 井上博 編集 先端医学社 東京, pp. 72-82, 2003



## 研究成果

### 心血管系における $K_{ATP}$ チャネルの役割

千葉大学大学院医学研究院薬理学<sup>1</sup>・細胞分子医学<sup>2</sup>

中谷晴昭<sup>1</sup>、鈴木将<sup>1</sup>、植村展子<sup>1</sup>、佐藤俊明<sup>1</sup>、小倉武彦<sup>1</sup>、玉川正次<sup>1</sup>、  
霊園良恵<sup>1</sup>、斎藤智亮<sup>1</sup>、三枝紀子<sup>1</sup>、三木隆司<sup>2</sup>、清野進<sup>2</sup>

#### I.はじめに

古くから心筋を低酸素状態におくと活動電位幅が短縮することが知られていた。1983年野間により心筋細胞において細胞内ATPが減少したときに活性化されるATP感受性 $K^+$  ( $K_{ATP}$ ) チャネルが発見された<sup>1)</sup>。その後、同様の $K_{ATP}$  チャネルが膵臓ランゲルハンス島 $\beta$ 細胞<sup>2)</sup>、骨格筋細胞<sup>3)</sup>、神経細胞<sup>4)</sup>、血管平滑筋細胞等<sup>5)</sup>にも存在することも明らかとなった。また、グリベンクラミドなどの経口糖尿病治療薬がこの $K_{ATP}$  チャネルを抑制する薬物であり<sup>6)7)</sup>、クロマカリム、ピナシジル、ニコランジル等の薬物がこの $K^+$  チャネルを活性化する薬物であることも明らかとなった(図1)<sup>8)10)</sup>。

1990年代の半ばになり、清野らのグループによって $K_{ATP}$  チャネルの分子構造が同定され<sup>11)12)</sup>、その後これらのチャネルポア分子のノックアウトマウスも作成されるに至った<sup>13)14)</sup>。それらの遺伝子改変動物の機能的解析を行うことによって、 $K_{ATP}$  チャネルの病態生理学的役割の理解がますます深まりつつある。ここでは、遺伝子改変動物を用いて明らかとなった心血管系における $K_{ATP}$  チャネルの役割について述べてみたい。

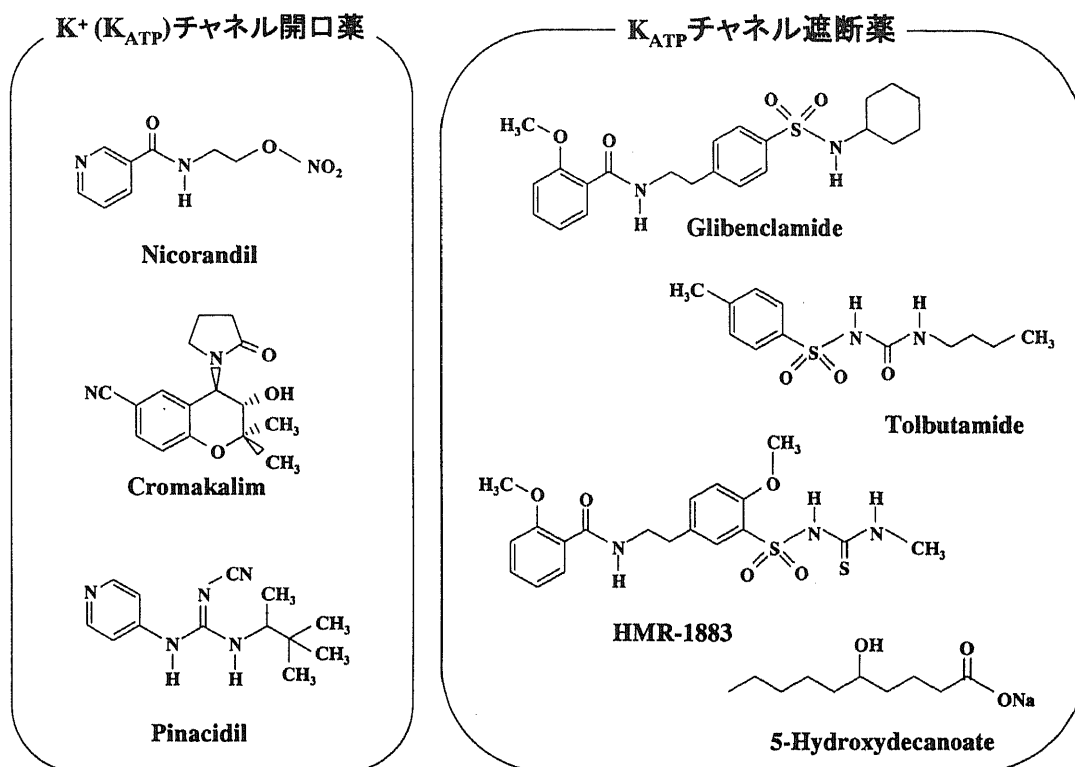


図1 K<sup>+</sup>チャンネル開口薬および K<sub>ATP</sub> チャンネル遮断薬の化学構造

## II. K<sub>ATP</sub> チャンネルの分子構造

1995年、稲垣らは新しい膜2回貫通型の内向き整流 K<sup>+</sup> チャンネルをクローニングしたが（現在 Kir6.1 と呼ばれているもの）、それは多くの組織に遍在しているものであり、その蛋白だけでは明らかな K<sub>ATP</sub> チャンネルとしての機能は認められなかった<sup>12)</sup>。同年、Aguilar-Bryan らのグループによってスルフォニルウレア薬と高親和性を持つ蛋白、すなわちスルフォニルウレア受容体 (SUR1) がクローニングされた<sup>15)</sup>。そこで清野らのグループは、Kir6.1 と約 71% の相同性を持ち、膵臓などに分布する新たなクローン Kir6.2 を SUR1 と共発現させると、K<sub>ATP</sub> チャンネルとしての機能が現れる事を報告した<sup>11)</sup>。その後、心筋や骨格筋に存在する SUR2 (SUR2A)<sup>16)</sup>、そのスプライスバリエントである SUR2B がクローニングされ<sup>17)</sup>、各種臓器における K<sub>ATP</sub> チャンネルの電気生理学的特性および薬物の感受性などを決定する要因になることが示されている。現在、K<sub>ATP</sub> チャ

ネルの分子構造は、図2に示すように、膜2回貫通型蛋白である Kir6.2 あるいは Kir6.1 の4量体からなるポア成分と、それを取り囲むスルフォニルウレア受容体からなると考えられている<sup>18)</sup>。

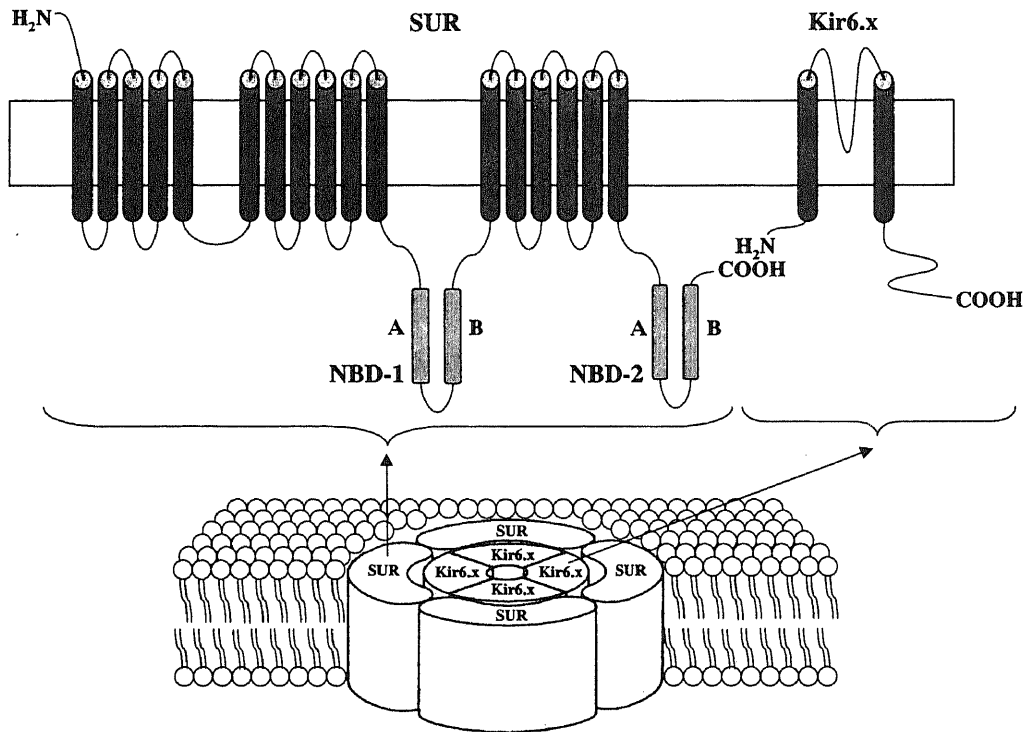


図2 K<sub>ATP</sub>チャネルの分子構造。K<sub>ATP</sub>チャネルは Kir6.x の4量体と SUR の4量体が組み合わさって機能すると考えられている。

### Ⅲ. 遺伝子改変動物を用いた心臓および血管 K<sub>ATP</sub>チャネルの機能分子同定

K<sub>ATP</sub>チャネルに関する遺伝子改変動物は表1のようなものが現在まで作成されている。ここでは Kir6.1 あるいは Kir6.2 の KO マウス<sup>13)14)</sup>を用いた研究を中心に述べることにする。

野生型および Kir6.2 のノックアウト (KO) マウスの心臓から酵素的に心筋細胞を単離し、パッチクランプ法を用いて膜電流を記録した<sup>19)</sup>。野生型心室筋細胞ではピナシジルにより濃度依存性に外向き電流が誘発され、その電流は

表1  $K_{ATP}$  チャネルの遺伝子改変動物

---

Kir6.2 のドミナントネガティブのトランスジェニック (TG) マウス <sup>55)</sup>
Kir6.2 のノックアウト (KO) マウス <sup>13)</sup>
SUR1 のノックアウト (KO) マウス <sup>56)</sup>
SUR2 のノックアウト (KO) マウス <sup>57)</sup>
ATP-insensitive Kir6.2 のトランスジェニック (TG) マウス <sup>58)</sup>
Kir6.1 のノックアウト (KO) マウス <sup>14)</sup>

---

グリベンクラミドによって抑制された (図 3)。一方、Kir6.2 KO マウスの心室筋細胞ではピナシジルによる外向き電流の増強は認められなかった。これらの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し、ピナシジルを与えると、野生型マウスの心室筋細胞では活動電位幅の著明な短縮がおき、それはグリベンクラミドの添加で対照時のレベルにまで回復した。しかしながら、Kir6.2 KO マウスの心室筋細胞ではピナシジルでも活動電位幅はほとんど変化しなかった (図 3)。これらの結果から心筋細胞の  $K_{ATP}$  チャネル活動には Kir6.2 ポア蛋白は必須であることが明らかとなった<sup>19)</sup>。

また、この細胞膜  $K_{ATP}$  チャネル機能の有無は、摘出心における  $K^+$  チャネル開口薬による心収縮力の変化の有無に反映された。ランゲンドルフ心において左室に挿入したバルーンで左室内圧を測定し、ピナシジルを灌流すると野生型マウス摘出心では収縮力低下が認められたが、Kir6.2 KO マウス摘出心では  $K^+$  チャネル開口薬による陰性変力反応は認められなかった<sup>19)</sup>。

それでは心筋細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルのポア成分は Kir6.2 のみで形成されているのであろうか。この疑問に答えるべく Kir6.1 の KO マウスが作成されたので、

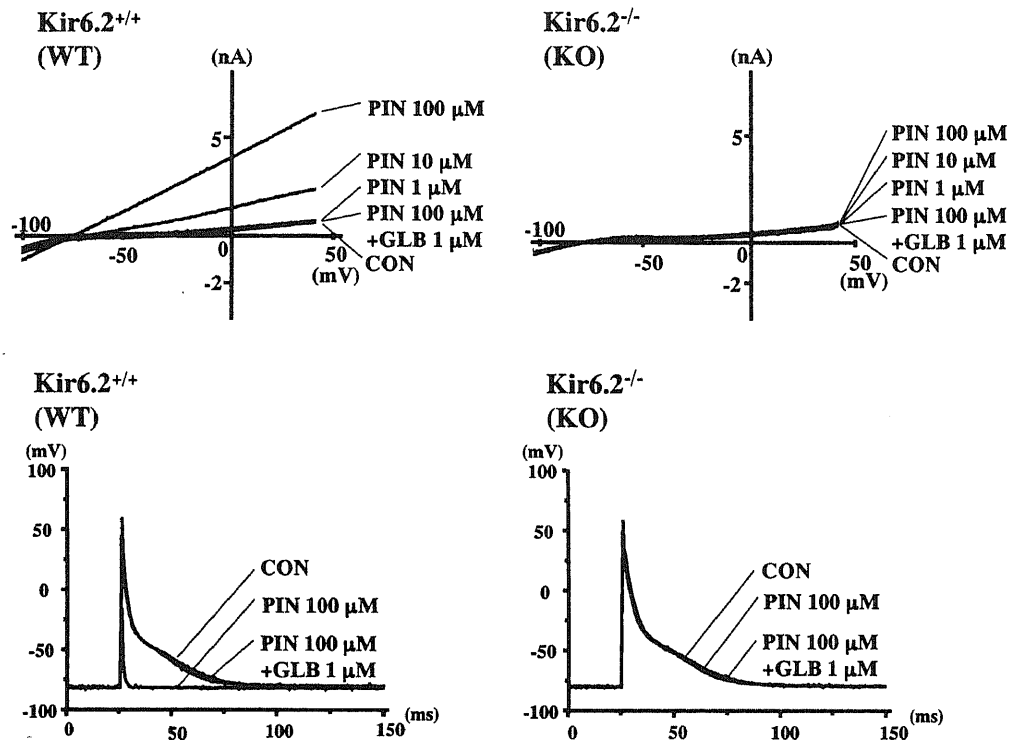


図3 野生型(Kir6.2<sup>+/+</sup>, WT)および Kir6.2 KO マウス (Kir6.2<sup>-/-</sup>) の心室筋細胞膜電流と活動電位に対するピナシジル (PIN) およびグリベンクラミド (GLB) の作用。野生型心室筋細胞において対照時 (CON) から PIN は濃度依存性に外向き K<sup>+</sup>電流を活性化すると共に活動電位

その単離心室筋細胞を用いて同様の電気生理学的実験を行った。Kir6.1 KO マウスの心室筋細胞では、野生型マウスの心室筋細胞と同様にピナシジルで外向き電流が活性化し、活動電位幅が短縮した (図4) <sup>14)</sup>。このことは、心筋細胞膜 K<sub>ATP</sub> チャネルのポア成分に Kir6.2 とともに Kir6.1 が含まれることを完全に否定するものではないが、心筋細胞では Kir6.2 が非常に重要であることを意味するものである。

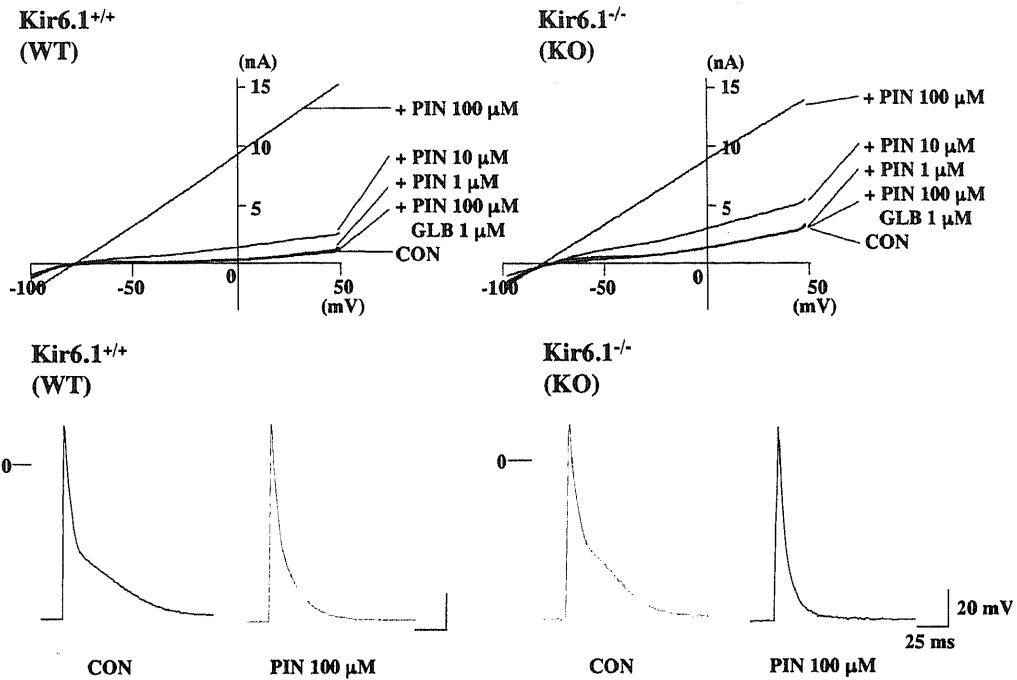


図4 野生型(Kir6.1<sup>+/+</sup>, WT)およびKir6.1 KO マウス (Kir6.1<sup>-/-</sup>) の心室筋細胞膜電流と活動電位に対するピナシジル (PIN) およびグリベンクラミド (GLB) の作用。野生型およびKir6.1 KO マウス心室筋細胞において対照時 (CON) からPINは濃度依存性に外向きK<sup>+</sup>電流を活性化すると共に活動電位を短縮し、これらの作用はGLBの添加で消失した。文献14)より引用、改変。

次に血管平滑筋細胞におけるK<sub>ATP</sub>チャンネルの機能分子の同定を試みた。野生型およびKir6.2 KO マウスから大動脈リング標本を摘出し、ノルエピネフリンであらかじめ収縮させておき、それに対するK<sup>+</sup>チャンネル開口薬の弛緩作用を検討した(図5)。野生型およびKir6.2 KO マウスの大動脈標本においてK<sup>+</sup>チャンネル開口薬のピナシジルは同程度の弛緩作用を示した<sup>19)</sup>。しかしながら、Kir6.1 KO マウスの大動脈標本ではピナシジルの弛緩作用は減弱していた<sup>14)</sup>。これらから血管平滑筋のK<sub>ATP</sub>チャンネルのポア成分はKir6.1からなることが示唆された。これらの知見はin vivoにおいても確かめられた。麻酔下の野生型、Kir6.2 KO マウスおよびKir6.1 KO マウスにおいてK<sup>+</sup>チャンネル開口薬のピナシジルを

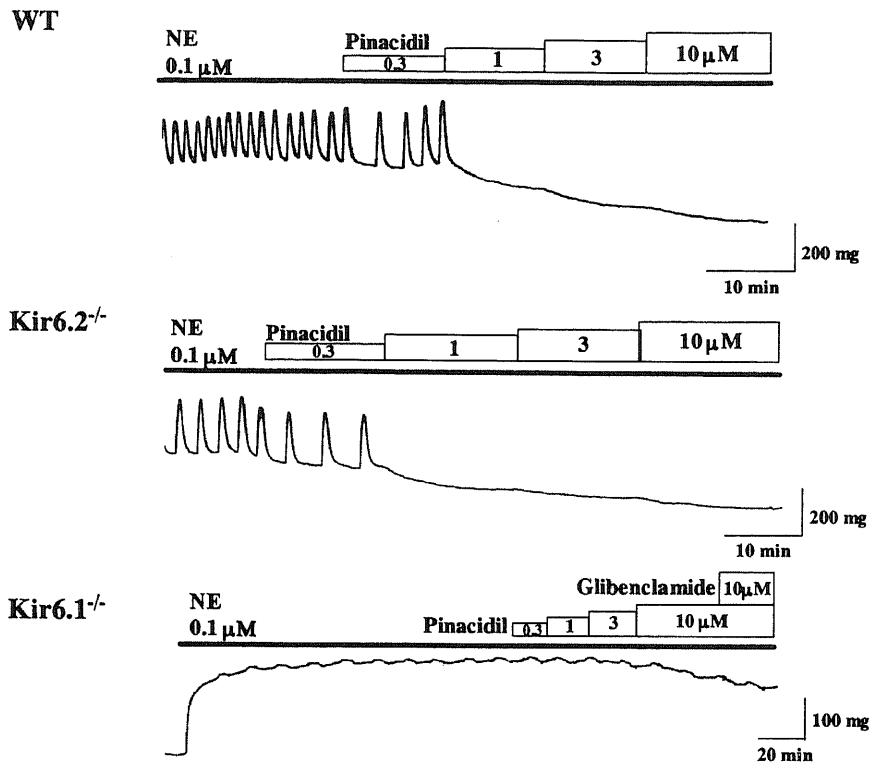


図5 野生型 (WT)、Kir6.2 および Kir6.1 KO マウスの大動脈標本におけるピナシジルによる弛緩反応。摘出大動脈標本をあらかじめノルエピネフリンで収縮させておきピナシジルを加え弛緩作用を観察した。WT および Kir6.2<sup>-/-</sup>マウスの大動脈標本では弛緩反応が観察されたが Kir6.1<sup>-/-</sup>マウスの大動脈標本では弛緩反応は認められなかった。文献 14) および 19)より引用、改変。

静注すると野生型および Kir6.2 KO マウスでは血圧低下反応が観察されたが、Kir6.1 KO マウスでは認められなかった (図6) 14)19)。このことは細い抵抗血管においても K<sup>+</sup> チャネル開口薬によって活性化する K<sub>ATP</sub> チャネルのポアの機能分子は Kir6.1 であることを示唆するものである。

血管平滑筋細胞膜の K<sub>ATP</sub> チャネルポアの機能分子は Kir6.2 ではなく、Kir6.1 であるということは、さらに電気生理学的実験によっても確認された。酵素的にこれらのマウスの大動脈から血管平滑筋細胞を単離し、全細胞膜電流を記録

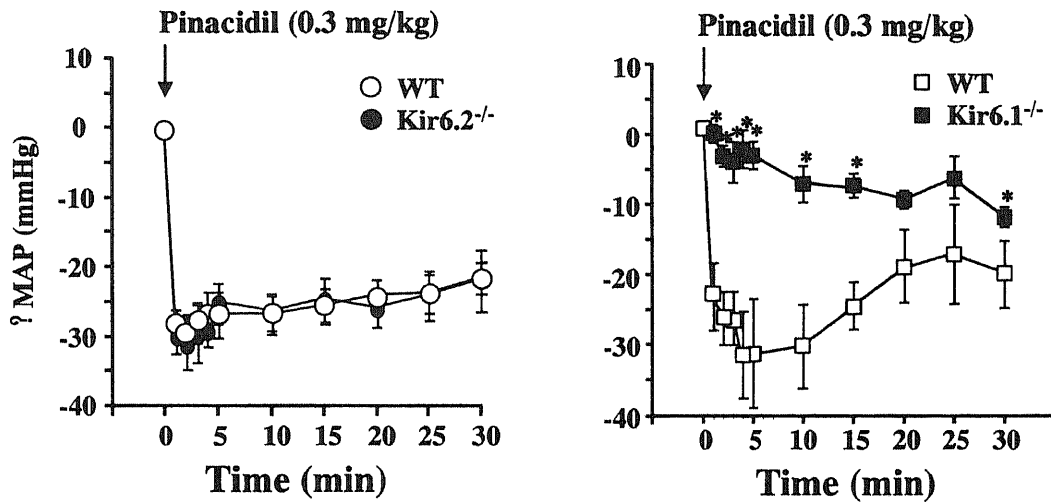


図6 麻酔下の野生型 (WT)、Kir6.2 および Kir6.1 KO マウスにおける  $K^+$ チャンネル開口薬ピナシジルの降圧作用。縦軸は平均血圧 (MAP) を示してある。ピナシジルは WT および Kir6.2 KO マウスで降圧をおこしたが Kir6.1 KO マウスでは明らかな降圧を引き起こさなかった。文献 14) および 19) より引用、改変。

した。野生型および Kir6.2 KO マウスの血管平滑筋細胞ではピナシジルによりグリベンクラミド感受性の  $K_{ATP}$  チャンネル電流が誘発されたが、Kir6.1 KO マウスの血管平滑筋細胞ではその電流は誘発されなかった (図7) 14)19)。

以前より、平滑筋のスルフォニルウレア受容体は SUR2B であるとされている 20)。血管平滑筋細胞の  $K_{ATP}$  チャンネルのポア成分に関しては、再構成系での電気生理学的実験から Kir6.2 よりむしろ Kir6.1 からなり、従来から単離血管平滑筋細胞で記録され、ADP で活性化する  $K_{NDP}$  チャンネルであることが山田らにより示唆されている 21)。これらの KO マウスの機能的実験から得られた結果は、山田らの仮説を支持するものである。



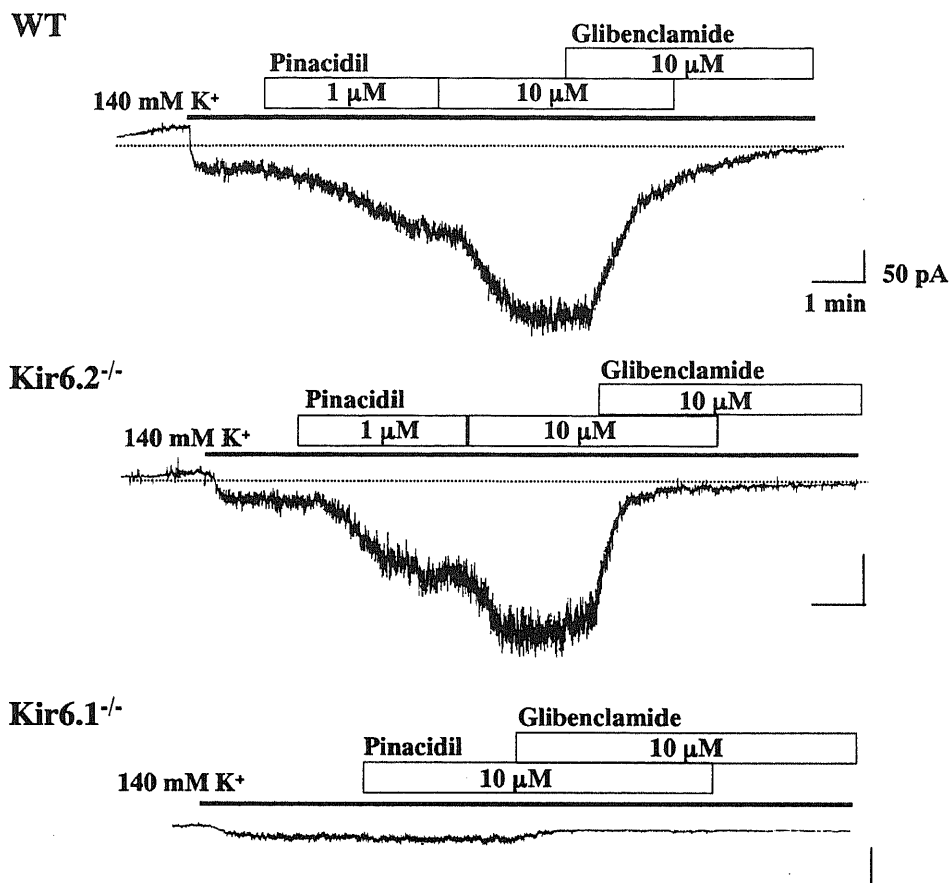


図7 野生型 (WT)、Kir6.2 (Kir6.2<sup>-/-</sup>) および Kir6.1KO マウス (Kir6.1<sup>-/-</sup>) の大動脈平滑筋細胞における  $K_{ATP}$  電流誘発作用。ピナシジルは WT および Kir6.2 KO マウスの大動脈平滑筋細胞でグリベンクラミド感受性の  $K_{ATP}$  電流を誘発したが、Kir6.1KO マウスの大動脈平滑筋細胞では電流を誘発しなかった。文献 14) および 19) より引用、改変。

#### IV. 心血管系における $K_{ATP}$ チャンネルの病態生理的役割

心筋細胞において  $K_{ATP}$  チャンネルが発見された時から、この  $K^+$  チャンネルは心筋虚血時に開口して活動電位幅を短縮させて、虚血心筋細胞内への  $Ca^{2+}$  流入を抑制して心筋保護的に働くとされて来た。しかしながら、最近、細胞膜に存在するこの  $K_{ATP}$  チャンネル開口以外の虚血心筋保護機構が注目されるようになって

ている。例えば、冠動脈閉塞による心筋梗塞巣の大きさは、その冠動脈閉塞に先立って短時間の心筋虚血を繰り返すと逆に縮小するという現象、いわゆる ischemic preconditioning (IPC) が生じるということが良く知られている<sup>22)-24)</sup>。この現象の成立には従来は細胞膜  $K_{ATP}$  チャンネルの開口が重要であるとされてきたが、近年は心筋細胞のミトコンドリアには別の種類の  $K_{ATP}$  チャンネルが存在し、その開口が IPC や  $K^+$  チャンネル開口薬による虚血心筋保護機構において重要な役割を果たすというものである (図 8)<sup>25)</sup>。このような仮説が提唱された背景にはいくつかの実験的研究の報告があった。すなわち、 $K^+$  チャンネル開口薬が

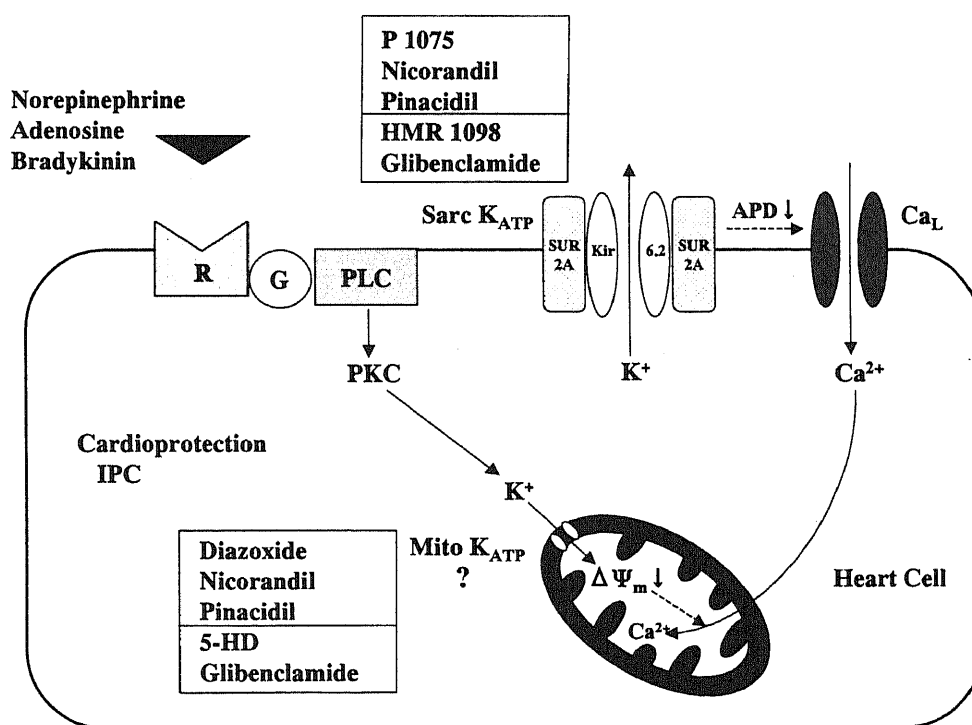


図 8 細胞膜(Sarc)およびミトコンドリア (Mito)  $K_{ATP}$  チャンネル活性化を介する虚血心筋保護機構。Ischemic preconditioning (IPC)は内因性の生体内物質がそれぞれの受容体(R)に結合し、フォスホリパーゼ C (PLC)、プロテインキナーゼ C (PKC) の活性化を介して Mito $K_{ATP}$  チャンネルを開口してミトコンドリア内膜電位 ( $\Delta \Psi_m$ ) を減少させ、ミトコンドリア内への  $Ca^{2+}$  の流入を抑制する。一方、Kir6.2 と SUR2A からなる Sarc  $K_{ATP}$  チャンネルが活性化すると活動電位幅が短縮して L 型  $Ca^{2+}$  チャンネル ( $Ca_L$ ) を介した  $Ca^{2+}$  流入が抑制され心筋保護的に働くと考えられる。Sarc および Mito $K_{ATP}$  チャンネルに対する開口薬(上段)、遮断薬(下段)があり図中に示してある。

梗塞巣を縮小する際でも单相活動電位の短縮は必ずしも認められなかったこと<sup>26)</sup>、また、Ⅲ群抗不整脈薬によって活動電位幅を延長させた場合でも IPC という現象は保たれていたと言うものである<sup>27)28)</sup>。このような実験成績から、細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルとは異なった分子機構によって虚血心筋が保護されるが、その一つの可能性がミトコンドリアに存在する  $K_{ATP}$  チャネルの活性化であるとするものである。実際、ミトコンドリア膜から  $K_{ATP}$  チャネル活動が記録されたし<sup>29)30)</sup>、ジアゾキシドおよび5-ヒドロキシデカノエート (5HD) がこの  $K_{ATP}$  チャネルの特異的開口薬および遮断薬であり<sup>31)32)</sup>、その活性化が  $K^+$  チャネル開口薬の心筋保護作用に重要であるという報告がなされている<sup>33)34)</sup>。虚血時にアデノシン受容体、 $\alpha_1$  受容体、ブラジキニン受容体などが刺激されるとプロテインキナーゼ C の活性化がおこり、それによってミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの開口がおこり、IPC が成立する可能性も指摘されている (図 8)<sup>25)35)</sup>。

しかしながら、ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの分子実体は明らかとなっていない。Seharaseyon らは、ウサギ心室筋細胞に adenovirus を用いて Kir6.1 あるいは Kir6.2 の dominant negative 遺伝子の導入を行った際、ジアゾキシドによるフラボプロテインの酸化反応で見たミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの機能は消失していなかったことから、Kir6.1 あるいは Kir6.2 はミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの構成成分でないことを間接的に示唆した<sup>36)</sup>。我々は Kir6.1 あるいは Kir6.2 の KO マウスの心室筋細胞を単離し、ジアゾキシドによるフラボプロテインの酸化反応を観察したところ、これらのどちらの心室筋細胞においてもその反応は保たれており、ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルのポア成分は Kir6.1 あるいは Kir6.2 でないことを直接的に証明した<sup>14)37)</sup>。今後、ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの分子構造の決定は不可欠であると思われる。

それでは、ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの開口がどの様に心筋細胞保護に結びつくのであろうか。ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルが開口するとミトコンドリア内膜の膜電位が減少し、その結果ミトコンドリア内への  $Ca^{2+}$  過負荷を減少させるというのが一つの可能性である。実際、 $K^+$  チャネル開口薬がミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルを活性化すると膜の脱分極と共に、ミトコンドリア内の  $Ca^{2+}$

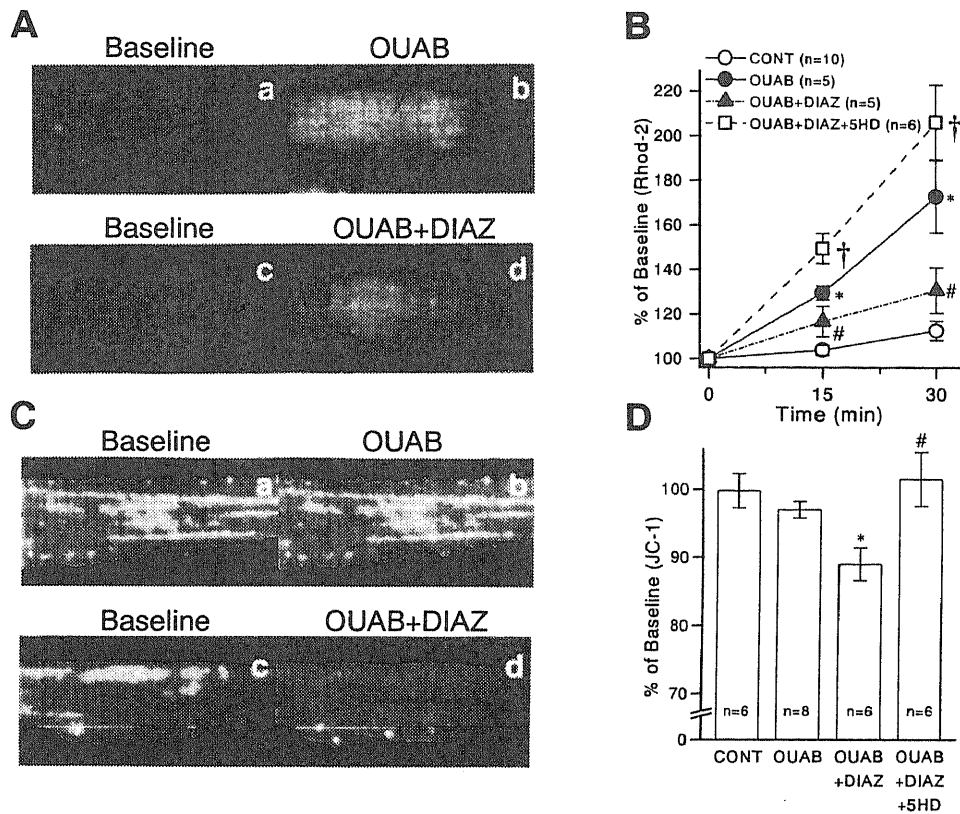


図9 ラット単離心室筋細胞におけるウアバイン (OUAB) 負荷におけるミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷 (A,B) およびミトコンドリア膜電位 (C,D) とそれに対するジアゾキシド (DIAZ) の作用。ジアゾキシドはミトコンドリア膜電位を減少させると共にウアバイン負荷におけるミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  過負荷を軽減させ、その作用は 5-hydroxydecanoate (5HD) で拮抗された。ミトコンドリア内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度およびミトコンドリア膜電位はそれぞれ Rhod-2、JC-1 という蛍光プローブを用いて共焦点顕微鏡を用いて測定した。文献 39) より引用、改変。

濃度を低下させることが報告されている (図 9) <sup>38)39)</sup>。もう一つの機序としては、ミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルの開口によってミトコンドリアマトリックスの膨化がおき、そしてミトコンドリアでのエネルギー産生が高まるという説 <sup>40)41)</sup>、ミトコンドリア  $\text{K}_{\text{ATP}}$  チャンネルの開口が reactive oxygen species (ROS) を産生し、それが心筋保護的に作用するという説 <sup>42)43)</sup> があるが未だその詳細は明らか

となっていない<sup>44)</sup>。

細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルの活性化の功罪については、古くからその二面性について論じられている。すなわち細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルが活性化して活動電位幅が短縮すると虚血心筋細胞内への  $Ca^{2+}$  流入が減少して心筋保護的に働くと思わ

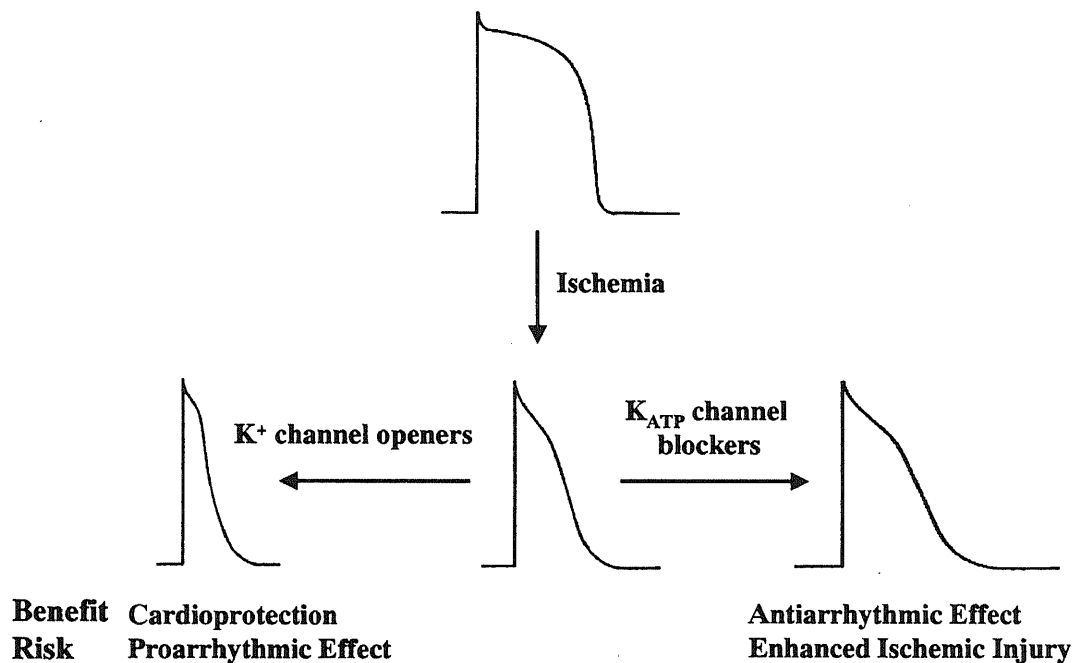


図 10 心筋虚血における  $K^+$ チャネル開口薬および  $K_{ATP}$  チャネル遮断薬の功罪。

れる。その一方で活動電位幅の短縮は不応期の短縮につながり心室細動などの致死的不整脈を誘発することになる (図 10)。事実、 $K^+$  チャネル開口薬の投与が心室細動などの心室性不整脈を誘発し、グリベンクラミドや HMR1883 (HMR1098) などの細胞膜  $K_{ATP}$  チャネル遮断薬が虚血性不整脈を抑制するという実験的成績も報告されている<sup>45)・47)</sup>。それでは細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルは虚血時の心室性不整脈を誘発するためのみに存在するのであろうか。この疑問に答えるべく細胞膜  $K_{ATP}$  チャネル機能が消失している Kir6.2 の KO マウスを用いて

実験を行った。

野生型および Kir6.2 KO マウスの心臓から酵素的に単離した心室筋細胞からナスタチン穿孔パッチクランプ法を用い、細胞内環境を正常に近い状態として膜電流および活動電位変化を観察した<sup>37)</sup>。単離した心筋細胞からランプパルスプロトコールで擬似定常電流を記録し、ジニトロフェノール (DNP 50  $\mu$ M) 含有無グルコース液で灌流すると野生型心室筋細胞で  $K_{ATP}$  チャネル電流の誘発が認められたが、Kir6.2KO マウスの心室筋細胞では擬似定常電流の変化は認められなかった (図 11)。また、活動電位幅も野生型の心室筋細胞ではこの虚血類似状態において短縮が認められたが、Kir6.2 KO マウスの心室筋細胞では

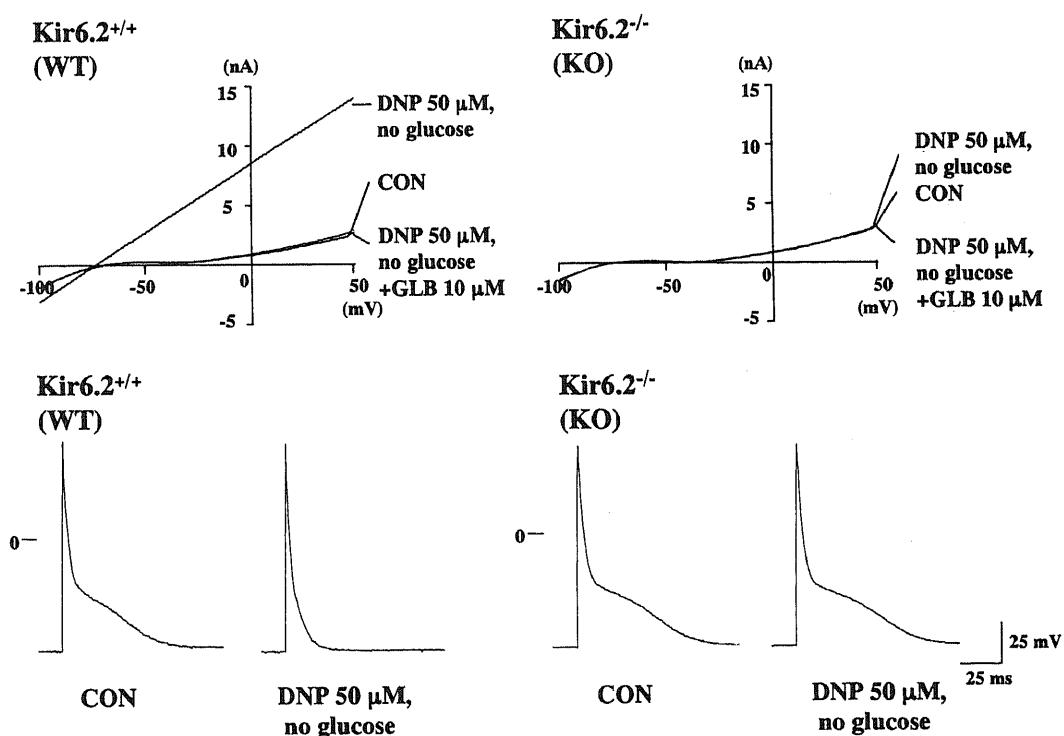


図 11 野生型(Kir6.2<sup>+/+</sup>, WT)および Kir6.2 KO マウス (Kir6.2<sup>-/-</sup>) の心室筋細胞膜電流と活動電位に対する代謝阻害(ジニトロフェノール (DNP) 50  $\mu$ M + 無グルコース) およびグリベンクラミド (GLB) の作用。野生型心室筋細胞において対照時 (CON) から代謝阻害によって外向き  $K^+$ 電流が活性化すると共に活動電位が短縮し、これらの作用は GLB の添加で消失した。しかしながら、Kir6.2 KO マウスの心室筋細胞ではこれらの反応は消失していた。文献 37)より引用、改変。

活動電位幅の短縮は認められなかった<sup>37)</sup>。これらから細胞膜  $K_{ATP}$  チャンネルの虚血類似状態に対する電気生理学的反応は  $K^+$  チャンネル開口薬に対するそれと同様に消失していることが明らかとなった。

それではこの Kir6.2 KO マウスにおいて IPC の心筋梗塞巣縮小効果は保たれているのであろうか。これを検証するために野生型および Kir6.2 KO マウスにおいて IPC の心筋梗塞巣に対する影響を検討した<sup>37)</sup>。麻酔下の野生型および Kir6.2 KO マウスで冠動脈を 45 分閉塞し 120 分再灌流して triphenyltetrazolium chloride (TTC) で染色を行い area at risk (AAR) との割合から心筋梗塞巣を算出した。野生型マウスでは、45 分の冠動脈閉塞に先立ち 3 分の冠動脈閉塞を 5 分間隔で 3 回繰り返して IPC を行うと梗塞サイズは有意に減少した。これに対して Kir6.2 KO マウスでは、同じプロトコールで IPC

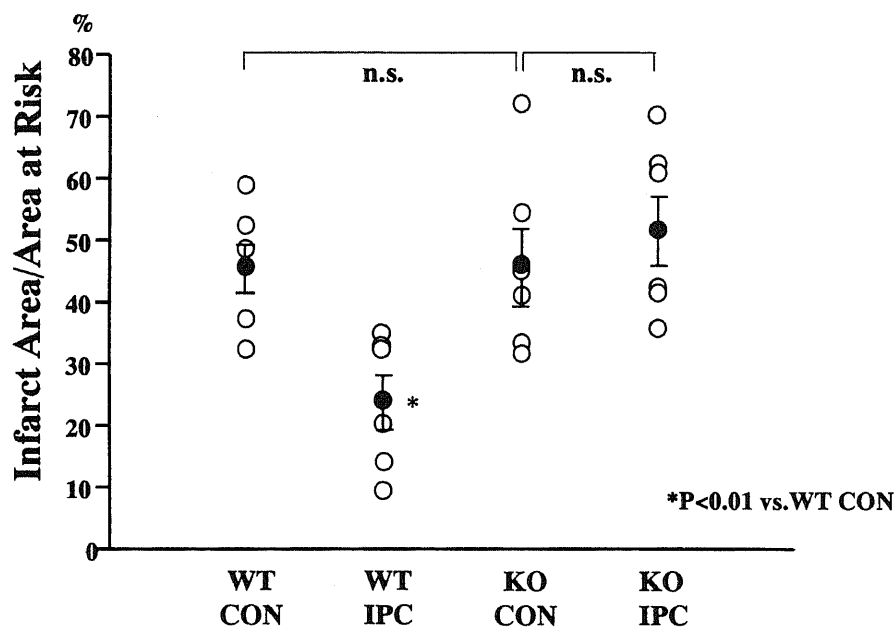


図 12 野生型 (WT) および Kir6.2 ノックアウトマウス (KO) における ischemic preconditioning (IPC) の心筋梗塞巣に対する影響。梗塞巣は TTC 染色で判定し、危険領域 (AAR) に対する割合として表現してある。WT マウスで麻酔下 45 分冠動脈閉塞 120 分再灌流を行った際の梗塞巣は、3 分の冠動脈閉塞を 5 分間隔で 3 回繰り返して IPC を行った場合、対照冠動脈閉塞 (WT-CON) に比し有意の梗塞巣の減少が認められたが、KO では認められなかった。文献<sup>37)</sup>より引用、改変。

を行っても梗塞サイズの減少は認められず、IPC は消失していた (図 12)。このことは IPC の成立においても、少なくともマウスにおいては細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルの存在は必須であることを意味している。同じ様な現象はイヌを用いた実験においても認められ、細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルの遮断は IPC による心筋梗塞巣減少効果をすべてではないが消失させたと報告されているし<sup>48)</sup>、通常は IPC の成立が主にミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの活性化に依存するとされるウサギにおいても、ジゴキシンの投与によって間接的に細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルを抑制した際にも IPC が消失することが報告されている<sup>49)</sup>。

これらの実験結果の機序をさらに詳細に検討するために野生型および Kir6.2 KO マウスの摘出ランゲンドルフ灌流心を用いてさらに実験を行った。左室内にバルーンを挿入して持続的に左室内圧を測定しながら 20 分間灌流を遮断して虚血とした後 60 分間再灌流してそのときの左室機能を評価した。図 13 に示すように野生型マウスの摘出灌流心を虚血とすると左室拡張期圧が徐々に上昇し、再灌流後左室の収縮力は虚血前の約 50% 程度まで回復した。これに対して Kir6.2 KO マウスの摘出灌流心では同様に虚血とすると虚血時の左室拡張期圧の上昇がより高度であり、再灌流後の左室収縮力の回復も虚血前の 20% 程度にとどまっていた。また、詳細に記録を観察すると、Kir6.2 KO マウスの摘出灌流心では虚血後左室の興奮収縮がより長期間続いていることが明らかとなった。このことは虚血状態となっても活動電位幅が短縮せず、虚血心筋が収縮し続けていることを示唆するものであろう。野生型マウスの摘出灌流心をミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの特異的遮断薬である 5HD<sup>32)</sup> で処置すると、虚血時の左室拡張期圧の上昇はより高度となるものの、再灌流時の左室機能の回復は影響を受けなかった。しかしながら、細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルの特異的遮断薬である HMR1098<sup>32)</sup> で野生型マウス心を処置すると、Kir6.2 KO マウスの摘出灌流心と同様に再灌流時の機能回復は悪かった (図 13)。また、Kir6.2 KO マウス心を HMR1098 で処置した際には、当然ながら左室機能の回復に何ら影響を与えなかったが、5HD で処置すると虚血時の左室拡張期圧の上昇はより高度となる傾向が観察された。このように、Kir6.2 KO マウスの摘出灌流心あるいは



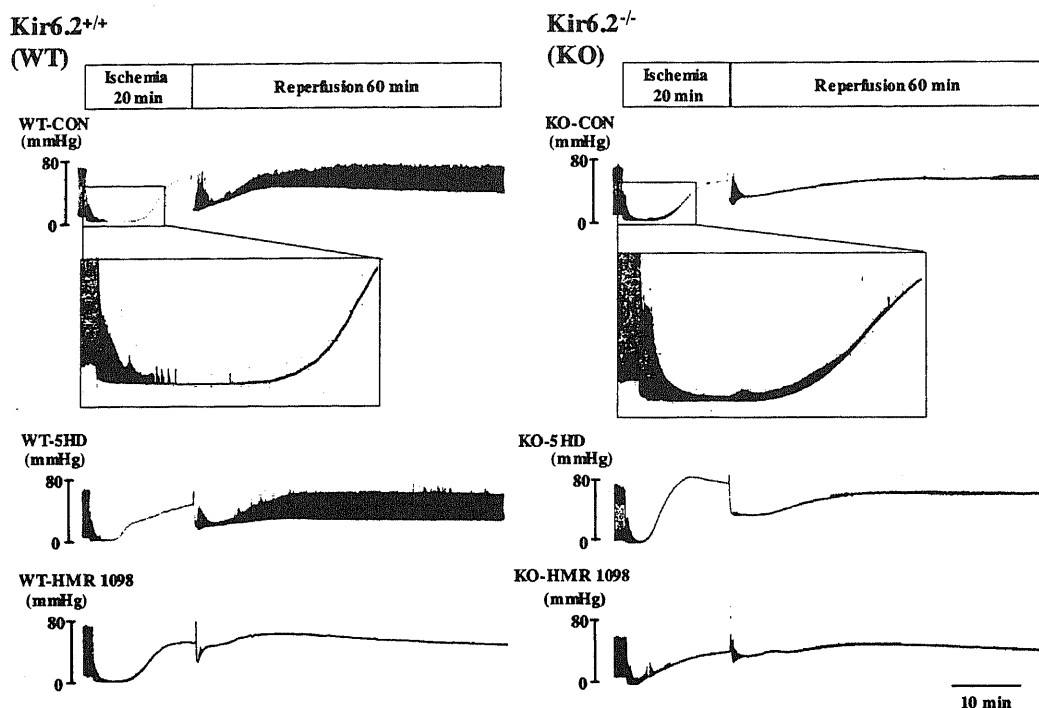


図 13 野生型(Kir6.2<sup>+/+</sup>, WT)および Kir6.2 KO マウス (Kir6.2<sup>-/-</sup>) の摘出ランゲンドルフ灌流心において 20 分間虚血とそれに続く 60 分間の再灌流を行った際の左室内圧変化。KO マウス (Kir6.2<sup>-/-</sup>) の摘出灌流心では虚血時より早期に左室拡張期圧が上昇し、再灌流後も収縮機能の回復は悪かった。野生型灌流心における再灌流後の収縮機能は 5-hydroxydecanoate (5HD) であまり影響を受けなかったが、HMR1098 で悪化した。文献 37) より引用、改変。

HMR1098 で処置した野生型マウスの摘出灌流心では虚血時に興奮収縮が消失せず、Ca<sup>2+</sup> 過負荷がおきて再灌流時の機能回復が悪くなることが示唆された。

また、マウス心を使った場合ミトコンドリア K<sub>ATP</sub> チャンネルの特異的開口薬とされるジアゾキシドもミトコンドリア K<sub>ATP</sub> チャンネルではなく細胞膜 K<sub>ATP</sub> チャンネルを開口して虚血心筋を保護することが明らかとなった<sup>50)</sup>。すなわち、ジアゾキシドで野生型マウス心では虚血・再灌流後の左室収縮力の回復を増強したが、Kir6.2 KO マウスの摘出灌流心ではジアゾキシドの改善作用は認められな

かった。そして、野生型マウスの摘出灌流心でのジアゾキシドの虚血・再灌流後心機能改善作用は 5HD で拮抗されずに HMR1098 の併用で消失した。また、野生型マウス灌流心の表面から記録した活動電位幅は虚血時に短縮するが、ジアゾキシド存在下ではその活動電位幅の短縮はさらに増強していた。これらの結果からジアゾキシドは少なくともマウス摘出心においては細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルを開口して虚血心筋を保護することが示唆された<sup>50)</sup>。ジアゾキシドは通常は SUR1 あるいは SUR2B に高い親和性を持ち、SUR2A への親和性が低いことから心筋細胞膜の  $K_{ATP}$  チャネルには作用しないと考えられてきたが、細胞内 ADP レベルが上昇すると心筋細胞でも細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルを開口することが最近示されている<sup>51)52)</sup>。したがって虚血などの病的状態においてはジアゾキシドも細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルを活性化すると考えられることから、この薬物を用いた実験成績の解釈には慎重であるべきと思われる。

このように心筋細胞での細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルは、当初野間らが提唱したように心筋保護的に作用していると思われる。これらの遺伝子改変動物を用いた実験はミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルの重要性を否定するものではない。細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルが全く機能しない場合には  $Ca^{2+}$  チャネルを介した  $Ca^{2+}$  の流入が高度となると共に、 $Na^+$ - $Ca^{2+}$  交換系を介した  $Ca^{2+}$  の処理が不十分となり、非常に多量の  $Ca^{2+}$  が細胞内に蓄積されることになって、ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャネルを介する心筋保護機構がもはや機能できなくなるのであろう。特にマウスは心拍数が高く、細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルの重要性が過大評価されている可能性もあるかもしれない。しかしながら最近、運動時あるいはカテコールアミン負荷時などで心拍数が上昇した時に細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルが開口し、心筋保護的に働くという可能性も Kir6.2 KO マウスを用いた実験から示唆されている<sup>53)</sup>。したがって細胞膜  $K_{ATP}$  チャネルは様々な病的あるいは生理的場面で心筋細胞を保護するために機能している重要な  $K^+$  チャネルであると思われる。

次に Kir6.1 の役割について述べることにする。Kir6.1 の KO マウスは非常に興味ある表現系を示した<sup>14)</sup>。すなわち生後数週間で突然死を起こすことが明らかとなったのでテレメトリーで心電図を記録したところ ST 上昇に伴い高度房

室ブロックをおこし死亡していた。既に述べたように、Kir6.1 は血管平滑筋細胞の細胞膜  $K_{ATP}$  チャンネルのポア成分であるから、冠動脈攣縮を疑い麻酔下のマウスを用いた *in vivo* 実験あるいは摘出心臓を用いた *in vitro* 実験においてメチルエルゴメトリンを負荷すると野生型マウスでは変化を起さなかったが、Kir6.1KO マウスでは冠動脈の攣縮と心電図の ST 上昇が観察された。これらの結果から Kir6.1KO マウスは Prinzmetal 型の狭心症を起こしたと考えられた<sup>14)</sup>。同様の表現系は SUR2 の KO マウスにおいても観察されたことが後に報告され興味深い<sup>54)</sup>。

## V. おわりに

以上、心血管系における  $K_{ATP}$  チャンネルの役割について、遺伝子改変動物を用いて明らかになったことを中心に述べてきた。野間によって発見された  $K_{ATP}$  チャンネルの分子構造が清野らのグループによって決定され、さらにその機能的意義が遺伝子改変動物を用いた研究によって次々と明らかにされつつある。しかしながら、ミトコンドリア  $K_{ATP}$  チャンネルの分子構造、心筋に存在する Kir6.1 の役割などまだまだ明らかにしなければならない点が多い。今後、これらが明らかとなり、それぞれの  $K_{ATP}$  チャンネルを標的とする薬物が開発され、様々な循環器疾患の治療学的進歩につながることを望まれる。

## 引用文献

- 1) Noma A: ATP-regulated  $K^+$  channels in cardiac muscle. *Nature*, 1983; 305: 147-148
- 2) Cook DL, Hales CN: Intracellular ATP directly blocks  $K^+$  channels in pancreatic  $\beta$  cells. *Nature*, 1984; 311: 271-273
- 3) Spruce AE, Standen NB, Stanfield PR: Voltage-dependent ATP-sensitive potassium channels of skeletal muscle membrane. *Nature*, 1985; 316: 736-738

- 4) Ashford ML, Sturgess NC, Trout NJ, Gardner NJ, Hales CN: Adenosine-5'-triphosphate-sensitive ion channels in neonatal rat cultured central neurons. *Pflugers Arch*, 1988; 412: 297-304
- 5) Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT: Hyperpolarizing vasodilators activates ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in arterial smooth muscle. *Science*, 1989; 245: 177-180
- 6) Sturgess NC, Ashford MLJ, Cook DL, Hales CN: The sulfonylurea receptor may be an ATP-sensitive potassium channel. *Lancet*, 1985; 8453: 474-475
- 7) Zunkler BJ, Lenzen S, Manner K, Panten U, Trube G: Concentration-dependent effects of tolbutamide, meglitinide, glipizide, glibenclamide and diazoxide on the ATP-regulated K<sup>+</sup> currents in pancreatic  $\beta$  cells. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol*, 1988; 337: 225-230
- 8) Escande D, Thuringer D, Le Guerns S, Caver I: The potassium channel opener cromakalim (BRL 34915) activates ATP-dependent K<sup>+</sup> channels in isolated cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988, 154: 620-625
- 9) Arena JP, Kass RS: Enhancement of potassium-sensitive current in heart cells by pinacidil: evidence for modulation of the ATP-sensitive potassium channel. *Circ Res*, 1989; 65:436-445
- 10) Hiraoka M, Fan Z: Activation of ATP-sensitive outward K<sup>+</sup> current by nicorandil (2-nicotinamidoethyl nitrate) in isolated ventricular myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1989; 250: 278-285
- 11) Inagaki N, Gono T, Clement JP IV, Namba N, Inazawa J, Gonzalez G, Aguilar-Bryan L, Seino S, Bryan J. Reconstitution of  $I_{KATP}$ : An inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*, 1995; 270: 1166-1170
- 12) Inagaki N, Tsuura Y, Namba N, Masuda K, Gono T, Horie M, Seino Y, Mizuta M, Seino S. Cloning and functional characterization of a novel

- ATP-sensitive potassium channel ubiquitously expressed in rat tissues, including pancreatic islet, pituitary, skeletal muscle, and heart. *J Biol Chem*, 1995; 270: 5691-5694
- 13) Miki T, Nagashima K, Tashiro F, Kotake K, Yoshitomi H, Tamamoto A, Gono T, Iwanaga T, Miyazaki J, Seino S. Defective insulin secretion and enhanced insulin action in  $K_{ATP}$  channel-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95: 10402-10406
  - 14) 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
  - 15) Aguilar-Bryan L, Nichols CG, Wechsler SW, Clement JPIV, Boyd AEIII, Gonzalez G, Herrera-Sosa H, Nguy K, Bryan J, Nelson DA. Cloning of the  $\beta$ -cell sulfonylurea receptor : a regulator of insulin secretion. *Science*, 1995; 268: 423-426
  - 16) Inagaki N, Gono T, Clement JOIV, Wang CZ, Aguilar-Bryan L, Bryan J, Seino S. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Neuron*, 1996; 16: 1011-1017
  - 17) Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y, Matsuzawa Y, Kurachi Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive  $K^+$  channel. *J Biol Chem*, 1996; 271: 24321-24324
  - 18) Seino S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Ann Rev Physiol*, 1999; 61: 337-362
  - 19) 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 Kir6.2knockout mice. *Circ Res*, 2001; 88: 570-577
  - 20) Isomoto S, Kondo C, Yamada M, Matsumoto S, Higashiguchi O, Horio Y,

- Matsuzawa Y, Kurachi Y. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem*, 1996; 271: 24321-24324
- 21) Yamada M, Isomoto S, Matsumoto S, Kondo C, Shindo T, Horio Y, Kurachi Y. Sulfonylurea receptor 2B and Kir6.1 form a sulfonylurea-sensitive but ATP-insensitive K<sup>+</sup> channel. *J Physiol*, 1997; 499: 715-720
- 22) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74: 1124-1136
- 23) Liu GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial preconditioning. *Circulation*, 1990; 82: 609-619
- 24) Scott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. 1990; 66:1133-1142
- 25) Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*, 1999; 84: 973-979
- 26) Grover GJ, D'Alonzo AJ, Parham CS, Darbenzio RB. Cardioprotection with the K<sub>ATP</sub> opener cromakalim is not correlated with ischemic myocardial action potential duration. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995; 26: 145-152
- 27) Grover GJ, D'Alonzo AJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Darbenzio RB. Preconditioning is not abolished by the delayed rectifier K<sup>+</sup> channel blocker dofetilide. *Am J Physiol*, 1996; 40: H1207-H1214
- 28) Schultz EJ, Kwok WM, Hsu AK, Gross GJ. Terikalant, an inward-rectifier potassium channel blocker, does not abolish the cardioprotection induced by ischemic preconditioning in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 1998; 30: 1817-1825
- 29) Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature*, 1991; 352: 244-247
- 30) Zhang DX, Chen YF, Campbell WB, Zou AP, Gross GJ, Li PL. Characteristics and superoxide-induced activation of reconstituted

- myocardial mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Circ Res*, 2001; 89: 1177-1183
- 31) Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial  $K_{ATP}$  channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem*, 1996; 271: 8796-8799
- 32) Sato T, Sasaki N, Seharaseyon J, O'Rourke B, Marban E. Selective pharmacological agents implicate mitochondrial but not sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels in ischemic cardioprotection. *Circulation*, 2000; 101: 2418-2423
- 33) Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effects of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 1997; 81: 1072-1082
- 34) Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation*, 1998; 97: 2463-2469
- 35) Sato T, O'Rourke B, Marban E. Modulation of mitochondrial ATP-dependent  $K^+$  channels by protein kinase C. *Circ Res*, 1998; 83: 110-114
- 36) Seharaseyon J, Ohler A, Sasaki N, Fraser H, Sato T, Johns DC, O'Rourke B, Marban E. Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels proved by viral Kir gene transfer. *J Mol Cell Cardiol*, 2000; 32: 1923-1930
- 37) 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
- 38) Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive  $K^+$  channel openers prevent  $Ca^{2+}$  overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*, 1999;

519:347-360

- 39) Ishida H, Hirota Y, Genka C, Nakazawa H, Nakaya H, Sato T. Opening of mitochondrial  $K_{ATP}$  channels attenuates the ouabain-induced calcium overload in mitochondria. *Circ Res*, 2001; 89: 856-858
- 40) Tanonaka K, Taguchi T, Koshimizu M, Ando T, Morinaka T, Yogo T, Konishi F, Takeo S. Role of an ATP-sensitive potassium channel opener, YM934, in mitochondrial energy production in ischemic/reperfused heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999; 291: 710-716
- 41) Miura T, Liu Y, Kita H, Ogawa T, Shimamoto K. Roles of mitochondrial ATP-sensitive K channels and PKC in anti-infarct tolerance afforded by adenosine A1 receptor activation. *J Am Coll Cardiol*, 2000; 35: 238-245
- 42) Vanden Hoek TL, Becker LB, Shao Z, Li C, Schumacker PT. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 1998; 273: 18092-18098
- 43) Yao Z, Tong J, Tan X, Li C, Shao Z, Kim WC, Vanden Hoek TL, Becker LB, Head CA, Schumacker PT. Role of reactive oxygen species in acetylcholine-induced preconditioning in cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1999; 277: H2504-H2509
- 44) O'Rourke B. Pathophysiological and protective roles of mitochondrial ion channels. *J Physiol*, 2000; 529: 23-36
- 45) Wolleben CD, Sanguinetti MC, Siegel PKS. Influence of ATP-sensitive potassium channels modulators on ischemia-induced fibrillation in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1989; 21: 783-788
- 46) Chi L, Uprichard ACG, Lucchesi BR. Profibrillatory actions of pinacidil in a conscious canine model of sudden coronary death. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990; 15: 452-464
- 47) Billman GE, Englert HC, Scholkens BA. HMR 1883, a novel cardioselective inhibitor of the ATP sensitive potassium channel. Part II: Effects on susceptibility to ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia in conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998; 286: 1465-1473



- 48) Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. Role of mitochondrial and sarcolemmal  $K_{ATP}$  channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol*, 2001; 280: H256-H263
- 49) Haruna T, Horie M, Kouchi I, Nawada R, Tsuciya K, Akao M, Otani H. Coordinate interaction between ATP-sensitive  $K^+$  channel and  $Na^+$ ,  $K^+$ -ATPase modulates ischemic preconditioning. *Circulation*, 1998; 98: 2905-2910
- 50) Suzuki M, Saito T, Sato T, Tamagawa M, Miki T, Seino S, Nakaya H. Cardioprotective effect of diazoxide is mediated by activation of sarcolemmal but not mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels in mice. *Circulation*, 2003; 107: 682-685
- 51) D'haan N, Moreau C, Prost AL, Jacquet H, Alekseev AE, Terzic A, Vivaudou M. Pharmacological plasticity of cardiac ATP-sensitive potassium channels toward diazoxide revealed by ADP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 12162-12167
- 52) Matsuoka T, Matsuhita K, Katayama Y, Fujita A, Inageda K, Tanemoto M, Inanobe A, Yamashita S, Matsuzawa Y, Kurachi Y. C-Terminal tails of sulfonylurea receptors control ADP-induced activation and diazoxide modulation of ATP-sensitive  $K^+$  channels. *Circ Res*, 2000; 87: 873-880
- 53) Zingman LV, Hodgson DM, Bast PH, Kane GC, Perez-Terzic C, Gumina RJ, Pucar D, Bienengraeber M, Dzeja PP, Miki T, Seino S, Alekseev AE, Terzic A. Kir6.2 is required for adaptation to stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 13278-13283
- 54) Chutkow WA, Pu J, Wheeler MT, Wada T, Makielski JC, Burant CF, McNally EM. Episodic coronary artery vasospasm and hypertension develop in the absence of Sur2  $K_{ATP}$  channels. *J Clin Invest*, 2002; 110: 203-208
- 55) Miki T, Tashiro F, Iwanaga T, Nagashima K, Yoshitomi H, Aihara H, Nitta Y, Gono T, Inagaki N, Miyazaki J, Seino S. Abnormalities of

- pancreatic islet by targeted expression of a dominant-negative  $K_{ATP}$  channel. Proc Natl Acad Sci USA, 1997; 94: 11969-11973
- 56) Seghers V, Nakazaki M, DeMayo F, Aguilar-Bryan J. *SUR1* knockout mice: A model for  $K_{ATP}$  channel-independent regulation of insulin secretion. J Biol Chem 2000; 275: 9270-9277
- 57) Chutkow WA, Samuel V, Hansen PA, Pu J, Valdivia CR, Makielski JC, Burant CF. Disruption of *Sur*-containing  $K_{ATP}$  channels enhances insulin-stimulated glucose uptake in skeletal muscle. Proc Natl Acad Sci USA, 2001; 98: 11760-11764
- 58) Koster JC, Knopp A, Flagg TP, Markova KP, Sha Q, Enkvetchakul D, Betsuyaku T, Yamada KA, Nichols CG. Tolerance for ATP-insensitive  $K_{ATP}$  channels in transgenic mice. Circ Res, 2001; 89: 1022-1029