

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590206

研究課題名（和文） 心筋カリウムチャネル変異体の細胞内輸送障害と低温・薬剤によるレスキュー機構の解明

研究課題名（英文） The improved effect of hypothermic cultivation on the functional expression of human cardiac Kv1.5 channels

研究代表者

林 維光 (Ding Wei-Guang)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80242973

研究成果の概要（和文）：

ヒト心筋カリウム電流 (Kv1.5) の細胞内輸送に対する低温培養の作用機構を検討した。低温培養がKv1.5電流を著明に増大させた。Western blotting法によってKv1.5チャネルが68 kDのimmature protein（小胞体に存在）と75 kDのmature protein（細胞膜に発現・機能）として検出され、いずれも低温培養によって著明に増加した。免疫組織化学法によりKv1.5タンパク質の細胞膜における局在が著明に増加したことが観察された。また蔗糖密度勾配法の検討により低温条件下で、Kv1.5のmature proteinが明らかに細胞膜の分画にシフトした（Kv1.5の細胞内輸送が促進された）ことが認められた。さらにKv1.5膜輸送障害の変異体(I502A, I508A)を用いた検討では、低温培養により変異体の電流量、膜における局在はいずれも有意に増加した。

研究成果の概要（英文）：

We herein investigated the effect of low temperature exposure in the channel activity, expression, degradation and localization of human Kv1.5 (hKv1.5). In hKv1.5-expressing CHO cells, the currents significantly increased at a reduced temperature cultivation (28°C) in comparison to those observed at 37°C. A Western blot analysis confirmed that the protein levels (immature and mature proteins) of hKv1.5 were significantly elevated under hypothermic conditions. The treatment with a proteasome inhibitor, MG132, significantly increased the immature (but not the mature) hKv1.5 protein at 37°C; there were no changes in either the immature or mature hKv1.5 proteins at low temperature conditions after MG132 exposure, thus indicating that the enhancement of the mature hKv1.5 protein at reduced temperature may not result from the inhibition of proteolysis. Moreover, the hKv1.5 fluorescence signal in the HEK cells increased significantly on the cell surface at 28°C versus those cultured at 37°C. Importantly, the low temperature treatment markedly shifted the subcellular distribution of the mature hKv1.5 lighter fractions, which showed considerable overlap with the trans-Golgi component. Finally, the hypothermic treatment also rescued the protein expression and functional currents of trafficking-defective hKv1.5 mutants (I502A, I508A, located in the pore region). These results indicate that low temperature exposure stabilizes the protein in the cellular organs, modulates its recycling trafficking, thus enhancing functional hKv1.5 currents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：Kv1.5, 細胞内輸送, 低温培養, 心筋, 心房細動

1. 研究開始当初の背景

心筋細胞に発生する活動電位は、他の興奮性細胞（神経、分泌細胞、骨格筋、平滑筋など）におけるのと同様に、主に、膜タンパク質であるイオンチャネルを通るイオンの流れ（膜電流）によって形成される。ヒト心筋細胞（心房筋、心室筋）の活動電位の発生に関わるイオンチャネルとして、内向き電流を発生する膜電位依存性 Na⁺チャネルや Ca²⁺チャネル、外向き電流を発生する膜電位依存性 K⁺チャネルや内向き整流性 K⁺チャネルがあげられる。近年、イオンチャネルタンパク質の発現をコードする遺伝子の変異に伴ってイオンチャネルのさまざまな機能異常が惹起され、その結果、種々の不整脈（遺伝性 QT 延長症候群やブルガダ症候群）の発生に繋がることが明らかにされている[チャネル病, 2]。このようなチャネル遺伝子の変異によるチャネルタンパク質の機能障害の発生機転として、タンパク質の生成障害 (class 1)、細胞内輸送（トラフィック）障害 (class 2)、チャネルの開口（ゲーティング）障害 (class 3) およびイオン透過性の障害 (class 4) の4つの機序が考えられている。

超急速活性型遅延整流性 K⁺チャネル (I_{Kur} もしくは Kv1.5) は *KCNK5* 遺伝子によってコードされ、他の膜電位依存性 K⁺チャネルと同様に膜 6 回貫通型の構造 (S1~S6, 613 amino

acids) をもつ膜タンパク質であり、ヒトでは主に心房筋に発現してその活動電位の再分極過程を制御している。*KCNK5* 遺伝子の機能喪失 (loss of function) 型のナンセンス変異 (E375X) により心房筋活動電位の再分極過程に異常をきたし心房細動の発症に関わることが示唆されている。また *KCNK5* 遺伝子には多数の一塩基多型 (SNP) が見いだされており、チャネル電流量の減少やチャネル不活性化過程の遅延などのチャネルタンパク質の機能障害を伴うことが報告されている。しかし、現在までのところ *KCNK5* 遺伝子の変異や多型に伴う Kv1.5 チャネルタンパク質の機能障害に関わるメカニズムについてはほとんど解明されていない。

一方、我々はこれまで Kv1.5 チャネルの薬剤感受性を検討する目的でポア領域 (P, イオンの通過する領域) およびそれを挟む S5 ならびに S6 領域のアミノ酸残基をアラニンに置き換えてアラニンスキニング) 解析を行ってきた。Kv1.5 チャネルのポア (P) から S6 領域の数種類のアミノ酸のアラニン変異体 (T480A, I502A) では、ワイルドタイプ (WT) チャネルと比較して電流量が著しく減少しており (loss of function)、さらに興味深いことに、遺伝子導入後に細胞を低温 (28°C) で培養するとチャネル電流量が有意に回復する (レスキュー) ことを見いだした。またこの低温培養による電流の増大効果は WT チ

チャンネルにおいても認められた。しかし、どのように低温培養が心筋 Kv1.5 の機能を改善・促進させたのかは未だ明らかにはされていない。

2. 研究の目的

本研究課題ではパッチクランプ法, 免疫細胞化学法, ウェスタンブロットィング (WB) 法, 蔗糖勾配法などを駆使し, ヒト Kv1.5 チャンネルとその変異体を用い, チャンネルの発現量や細胞内輸送過程に対する低温培養や薬剤によるレスキュー効果のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1. GFP 付加 Kv1.5 チャンネルの作製: Kv1.5 チャンネルタンパク質の S1-S2 間の細胞外リンカーに GFP 遺伝子または FLAG タグを挿入して融合タンパク質 (GFP または FLAG 付加 Kv1.5 チャンネル) を作製する。
2. Kv1.5 チャンネル変異体の作製: 前述のように T480A および I502A 変異体が細胞内輸送障害を呈すると考えられる。ポア領域 (P, イオンの通過する領域) およびそれにかかわる S6 領域 (G497-V516) のアミノ酸残基をアラニンに置き換えた変異体の作製も行う。
3. チャンネルタンパク質の定量: WB 法により 68 kD の core-glycosylated protein (immature form; 小胞体内に存在) と 75 kD の fully-glycosylated protein (mature form; 細胞膜に輸送・発現) の 2 つのシグナル強度の比を求める。
4. パッチクランプ法によるチャンネル電流の記録: パッチクランプ法によりチャンネル電流を記録してチャンネルタンパク質の機能を解析する。

5. 細胞内局在の確認: 共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞全体の GFP 蛍光の観察および抗 GFP 抗体を作用させた時に得られるシグナル (細胞膜に存在する GFP 融合チャンネルタンパク質の存在を示す) を解析する (免疫細胞化学法)。

6. 細胞内輸送 (trafficking) に及ぼす低温培養の効果: 蔗糖勾配法を用い, 細胞を細胞膜 (Na/K-ATPase 局在), 小胞体, ゴルジ体分画 (Calnexin, GM130) に分けて, チャンネルの局在変化を調べる。

7. 糖鎖付加の程度に対する低温培養の効果: 低温作用が小胞体におけるチャンネルタンパク質の折りたたみや糖鎖添加にどう影響するかを調べ, 糖鎖添加阻害薬 (Tunicamycin) の存在下で低温培養の効果を検討する。

4. 研究成果

低温培養 (低温ストレス: 34°C, 31°C, 27°C の条件下) は, Kv1.5 電流を著明に増大させたことが明らかとなった。またこの電流量の増大は, チャンネルタンパク質の増加に比例することも確認できた。すなわち Western blotting 法によって Kv1.5 チャンネルが 68 kD の core-glycosylated protein (immature protein; 小胞体に存在) と 75 kD の fully-glycosylated protein (mature protein; 細胞膜に発現・機能) として検出されて, いずれも低温ストレスによって protein の発現が増加したことが明らかとなった。チャンネルの分解経路についての検討では, 細胞内 lysosome 機能が低温ストレスによるチャンネルタンパク質の増加に関与しなかったことが確認された。かわりに proteasome 機能を阻害すると immature protein が顕著に蓄積された。また薬剤で新生タンパク質の合成を止める実験条件下で, 低温培養すると immature protein が明らかに蓄積された。おそらく低温条件下で proteasome 活性の部分的な低下がチ

チャンネルタンパク質の増加にある程度関わっていることが示唆された。しかしproteasome分解系が低温培養によるmature protein量またはKv1.5電流の増加にほとんど影響を与えなかったことから、低温培養によるKv1.5発現の増大効果にほかの機序も関与していると推測される。

低温培養によるmature proteinに対する影響を詳しく検討するために種々の試みを行った。細胞から抽出された細胞膜タンパク質においてKv1.5 proteinが低温ストレスによって有意に増加したことが確認された。蔗糖密度勾配法の検討により、細胞内小器官を10数個の分画に分けて検討し、Kv1.5のmature proteinは、低温培養条件下で細胞膜の分画に有意にシフト（細胞内traffickingが促進された）した。

Kv1.5の細胞内分布様式に関して、Kv1.5抗体を用いた免疫組織化学法を行い、低温処理がKv1.5タンパク質の細胞膜における局在を有意に増加させた。また、低温培養がチャンネルタンパク質の糖鎖添加に影響を与えるかどうかについての検討を行い、37°C培養（対照）に較べて低温環境下でN-glycosylationが効率よく行われたことが観察された。

さらにKv1.5膜輸送障害の変異体(I502A, I508A)を用いて検討した。これらの変異体は電流密度が小さく、低温培養によって電流量、細胞膜における局在およびmature proteinの量は、いずれも有意に増加した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Nakajima T, Wu J, Kaneko Y, Ashihara T, Ohno S, Irie T, Ding WG, Matsuura H, Kurabayashi M, Horie M. (2012) KCNE3 T4A as the Genetic Basis of Brugada-Pattern Electrocardiogram. *Circ J*. 76:2763-72. (査読有)

2. Kimura H, Zhou J, Kawamura M, Itoh H, Mizusawa Y, Ding WG, Wu J, Ohno S, Makiyama T, Miyamoto A, Naiki N, Wang Q, Xie Y, Suzuki T, Tateno S, Nakamura Y, Zang WJ, Ito M, Matsuura H, Horie M. (2012) Phenotype variability in patients carrying KCNJ2 mutations. *Circ Cardiovasc Genet*. Jun;5(3):344-53. (査読有)
3. Han S, Yan DM, Zhao XF, Matsuura H, Ding WG, Li P, Jiang S, Du PG, Zhu X. (2012) GHGKHKNK octapeptide (P-5m) inhibits metastasis of HCCLM3 cell lines via regulation of MMP-2 expression in in vitro and in vivo studies. *Molecules* 17(2):1357-72. (査読有)
4. Wu J, Ding WG, Matsuura H, Horie M. (2012) Regulatory mechanisms underlying the modulation of GIRK1/GIRK4 heteromeric channels by P2Y receptors. *Pflugers Arch* 463:625-33. (査読有)
5. Ohno S, Zankov DP, Ding WG, Itoh H, Makiyama T, Doi T, Shizuta S, Hattori T, Miyamoto A, Naiki N, Hancox JC, Matsuura H, Horie M. (2011) KCNE5 (KCNE1L) variants are novel modulators of Brugada syndrome and idiopathic ventricular fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 4 (3):352-61. (査読有)
6. Ding WG, Toyoda F, Ueyama H, Matsuura H. (2011) Lysophosphatidylcholine enhances I_{Ks} currents in cardiac myocytes through activation of G protein, PKC and Rho signaling pathways. *J Mol Cell Cardiol*. 50:58-65. (査読有)
9. Nakamura H, Ding WG, Sanada M, Maeda K, Kawai H, Maegawa H, Matsuura H. (2010) Presence and functional role of the rapidly activating delayed rectifier K^+ current in left and right atria of adult mice. *Eur J Pharmacol*. 649:14-22. (査読有)

10. Toyoda F, Ding WG, Zankov DP, Omatsu-Kanbe M, Isono T, Horie M, Matsuura H. (2010) Characterization of the rapidly activating delayed rectifier potassium current, I_{Kr} in HL-1 mouse atrial myocytes. *J Membr Biol.* 235:73-87. (査読有)
11. Oka Y, Itoh H, Ding WG, Shimizu W, Makiyama T, Ohno S, Nishio Y, Sakaguchi T, Miyamoto A, Kawamura M, Matsuura H, Horie M. (2010) Atrioventricular block-induced Torsades de Pointes with clinical and molecular backgrounds similar to congenital long QT syndrome. *Circ J.* 25;74:2562-71. (査読有)
12. Wu J, Shimizu W, Ding WG, Ohno S, Toyada F, Itoh H, Zang WJ, Miyamoto Y, Kamakura S, Matsuura H, Nademanee K, Brugada J, Brugada P, Brugada R, Vatta M, Towbin JA, Antzelevitch C, Horie M (2010). KCNE2 modulation of Kv4.3 current and its role in inherited fatal rhythm disorders. *Heart Rhythm* 7:199-205. (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. Ding WG, Xie Y, Toyoda F, Matsuura H. The improved effect of hypothermic cultivation on the functional expression of human cardiac Kv1.5 channels. *Journal of Physiological Science* 63, S134, 2013. (第 90 回日本生理学会大会, 東京)
2. Xie Y, Ding WG, Matsuura H. Carmodolin potentiates IKs in guinea-pig SA node cells by activation Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Physiological Science* 63, S134, 2013. (第 90 回日本生理学会大会, 東京)
3. Toyoda F, Ding WG, Matsuura H. Positive correlation between I_{st} and $I_{ca,L}$ in guinea-pig sinoatrial node cells. *Journal of Physiological Science* 63, S121, 2013. (第 90 回日本生理学会大会, 東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 維光 (Ding Wei-Guang)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：80242973

(2) 研究分担者

滋賀医科大学・医学部・教授
松浦 博 (Matsuura Hiroshi)
研究者番号：60238962

滋賀医科大学・医学部・教授
尾松 万里子 (Omatsu-Kanbe Mariko)
研究者番号：80161397

豊田 太 (Toyoda Futoshi)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：90324574

(3) 連携研究者

なし

