

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670118

研究課題名(和文) 摘出灌流心を用いたイオンチャネルの細胞膜発現量変化の定量的イメージング法

研究課題名(英文) Imaging of quantitative changes in surface expression of ion channels using isolated perfused hearts

研究代表者

石井 邦明 (ISHII, KUNIAKI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：10184459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：摘出心において、KCNQ1(心臓の興奮性に対して重要な役割を有するK<sup>+</sup>チャネル)の細胞膜発現量の変化をリアルタイムで可視化できる系を確立することを目的に研究を行なった。

1. pHluorin(pH感受性が高いGFP変異体)とKCNQ1を融合させたコンストラクトを作製し、 $\alpha$ 1受容体刺激によってKCNQ1のエンドサイトーシスを起こし検討した。エンドサイトーシスによって酸性環境に置かれるため、pHluorinの蛍光が減弱することが期待されたが、顕著な変化は認められなかった。

2. よりpH感受性の高い変異体を得る目的で、大腸菌の系を用いてスクリーニングを開始したが、目的の変異体はまだ得られていない。

研究成果の概要(英文)：KCNQ1 is the pore-forming subunit of the slowly activating delayed rectifier K<sup>+</sup> channel that plays an important role in repolarization of cardiac action potential. This study was designed to develop the imaging method to visualize changes of surface expression of KCNQ1 in the isolated perfused animal hearts.

1. pHluorin (pHl), the GFP mutant with higher pH sensitivity, was fused to the extracellular region of KCNQ1 (KCNQ1-pHl).  $\alpha$ 1 adrenergic receptor ( $\alpha$ 1AR) was co-expressed with KCNQ1-pHl in HEK293 cells, and  $\alpha$ 1AR was stimulated to cause endocytosis of KCNQ1-pHl. Since inside of early endosome is acidic, pHl fluorescence was expected to be diminished. However, activation of  $\alpha$ 1AR did not lead to significant changes in pHl fluorescence.

2. To obtain a GFP mutant that has pH sensitivity higher than pHl, we started screening of cDNA clones using the E. coli protein expression system. Unfortunately, we could not obtain such a GFP mutant so far.

研究分野：循環薬理学

キーワード：Kチャネル イメージング 心臓 GFP変異体 pH

## 1. 研究開始当初の背景

代表的なチャネル病のひとつに、致死的不整脈を引き起こす QT 延長症候群 (LQT) がある。LQT1 型は KCNQ1 の異常であるが、KCNQ1 はヒト心室筋の再分極に寄与している  $I_{Ks}$  チャネル (ゆっくりと活性化する遅延整流性  $K^+$  チャネル) の主サブユニットであり、副サブユニット KCNE1 とで複合体 ( $I_{Ks}$  チャネル) を形成する。我々は、培養細胞発現系を用いて、GqPCR (Gq 蛋白共役型受容体) 刺激によって KCNQ1 がエンドサイトーシスされることを明らかにしていた。GqPCR として、アンジオテンシン受容体 1 型 ( $AT_1R$ ) および  $\alpha_1$  アドレナリン受容体 ( $\alpha_1AR$ ) を用いて検討したところ、特に  $\alpha_1AR$  の刺激によってコンスタントな KCNQ1 のエンドサイトーシスが観察された。そして、そのエンドサイトーシスはクラスリン依存性であり、ユビキチンが関与しているものと思われた。このように、GqPCR 刺激によって KCNQ1 の細胞膜発現量の低下が認められることは確かであったが、培養細胞の実験系での検討であり、その生理的意義は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

培養細胞発現系で明らかになった KCNQ1 のエンドサイトーシスが、生体内で意義を有していることを明らかにする前提として、器官レベルで同様の現象を観察する必要性を考え、本研究を計画した。

培養細胞の実験系においては、KCNQ1 の細胞外領域に HaloTag を導入し (KCNQ1-Halo) 共有結合する蛍光 Halo リガンドを用いて、KCNQ1-Halo をラベリングした。そして、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、生細胞での KCNQ1 の局在変化を観察した。器官レベルでの KCNQ1 の細胞膜発現量の変化を観察する上において、同様の方法は使用できないため、エンドサイトーシスされた膜蛋白が初期エンドソームを経由すること、そして初期エンドソーム内が酸性環境であることに注目した。それらのことから、緑色蛍光蛋白 (GFP) の変異体で、より高い pH 感受性 (酸性環境で蛍光が減弱する) を有する pHluorin (pHI) を用いることを考えた。pHI と KCNQ1 との融合蛋白を用いれば、KCNQ1 がエンドサイトーシスされた際に pHI の蛍光が減弱し、それによって、器官レベルでの KCNQ1 の細胞膜発現量変化を検出できる可能性がある。

本研究の目的は、動物摘出灌流心臓を用いて、KCNQ1 の細胞表面発現量をリアルタイムで可視化でき、かつ定量的評価が可能なモデルを確立することである。

## 3. 研究の方法

(1) KCNQ1-pHI、 $\beta_2AR$ -pHI の作製  
膜蛋白がエンドサイトーシスされると、そ

の細胞外領域が初期エンドソーム内に入るため、pHI を酸性環境にさらすことを目的に KCNQ1 の細胞外領域 (第 1-2 膜貫通領域を繋ぐループ) に pHI を付加したコンストラクト (KCNQ1-pHI) を作製した。また、アゴニスト刺激によるエンドサイトーシスが良く知られている  $\beta_2$  受容体のアミノ末端 (エンドソーム内に入る) に pHI を融合させたコンストラクト ( $\beta_2AR$ -pHI) を作製した。作製は PCR 法を用いて行なった。

(2) 哺乳動物培養細胞への発現

KCNQ1-pHI および  $\alpha_1AR$  を、Fugene6 を用いて HEK293 細胞にトランスフェクションし、発現させた。

(3) イメージング

KCNQ1-pHI と  $\alpha_1AR$  を発現させた HEK 293 細胞、および  $\beta_2AR$ -pHI を発現させた HEK 293 細胞 (コントロールとして) において、薬物による受容体刺激を行ない、その際の KCNQ1-pHI ならびに  $\beta_2AR$ -pHI の局在変化を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて経時的に観察した。

(4) 電気生理学的方法

KCNQ1-pHI を鋳型として、*in vitro* で合成した cRNA をツメガエル卵母細胞にインジェクションした。KCNQ1-pHI の機能を確認するために、KCNQ1-pHI を発現させた卵母細胞において、2 電極膜電位固定法を用いて全細胞電流を測定した。

(5) pH 感受性 Halo リガンドを用いた検討

KCNQ1-Halo を発現させた HEK293 細胞において、pH 感受性 Halo リガンド (酸性環境で蛍光が増大する) で KCNQ1-Halo をラベルし、共焦点レーザー顕微鏡を用いて局在変化を観察した。

(6) 大腸菌を用いた検討

pET22b (プラスミドベクター) に pHI をサブクローニングした後、大腸菌に導入することによって、pHI を大腸菌のペリプラズムに発現させた。そして、外部の pH 環境を変化させた際の蛍光変化を、実体顕微鏡を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) KCNQ1-pHI の機能の確認

KCNQ1-pHI を用いた KCNQ1 の局在変化についてのイメージングを行なう前提として、KCNQ1-pHI がイオンチャネルとして機能することを確認した。ツメガエル卵母細胞に KCNQ1-pHI を発現させ、電位固定法によって全細胞電流を記録した。

図 1 に示すように KCNQ1-pHI がイオンチャネルとして機能していることが確認できたため、作製したコンストラクトをその後の実験に用いた。

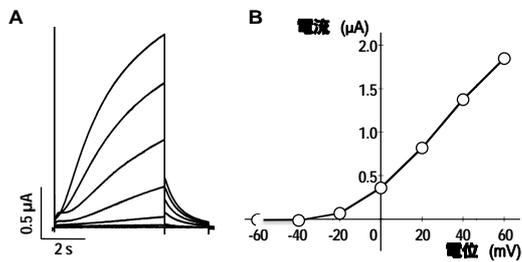


図 1. KCNQ1-pHl の電流 (A) と電流-電圧関係 (B)

## (2)細胞を用いたイメージング

KCNQ1-pHl を発現させた細胞において、 $\alpha_1$ AR 刺激によるエンドサイトーシスで pHl の蛍光強度が低下するかどうかを検討した。図 2B に示すように、細胞膜上の蛍光は減少しているが、細胞全体で見た時に、明らかに蛍光が暗くなることは観察できなかった (図 2A)。

$\beta_2$ AR-pHl を発現させた細胞において、同様の検討を行なったが、ほぼ同様の結果であった (図 2C, D)。 $\beta_2$ AR は刺激によってエンドサイトーシスを起こす代表的な受容体であるため、今回の目的を達成するために pHl を使用することは難しいものと考えられた。

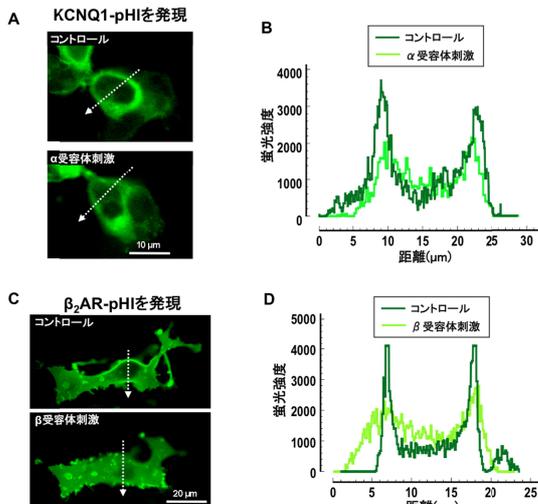


図 2. A, B: KCNQ1-pHl および  $\alpha_1$ AR を発現させた HEK293 細胞においてフェニレフリン投与により受容体を活性化し、pHl の蛍光を観察。C, D:  $\beta_2$ AR-pHl を発現させた HEK293 細胞においてイソプロテレノール投与により受容体を活性化し、pHl の蛍光を観察。

培養細胞を用いた検討の結果からすると否定的であったが、ツメガエル卵母細胞に KCNQ1-pHl を発現させ、細胞表面の蛍光強度を  $\alpha_1$ AR 刺激前後で観察した。結果として、蛍光の明らかな減弱は認められなかった。

また AcidiFluor ORANGE (市販の pH 感受性 Halo リガンド) を使用して、エンドサイトーシスを検出できるかどうか検討し

たが、ネガティブな結果であった。以上のデータから、現存する方法では目的とする変化を検出できないものと考えられた。

## (3)大腸菌の蛋白発現系を用いた検討

本研究の目的を達成するためには、中性環境と酸性環境における蛍光強度の差が、pHl よりも、かなり大きな GFP 変異体を得ることが必要と考えられた。そのため、大腸菌のペリプラズムに導入蛋白を発現させる系を使用し、検討を行った。

細胞外の pH 環境の変化に応じて、ペリプラズムに発現している蛋白周囲の pH 環境も変化すると考えられるため、大腸菌ペリプラズムに発現させた pHl の蛍光を観察した後 (図 3A)、pH を変化させ、蛍光強度への影響を検討した (図 3B)。pH = 7.4 から、pH = 5.5 に変化させたところ、明らかな蛍光の減弱が観察された。また、逆に pH = 8.5 に変化させた際には、蛍光の増強が観察された。これらの結果はほぼ報告されている pHl の性質を反映している。

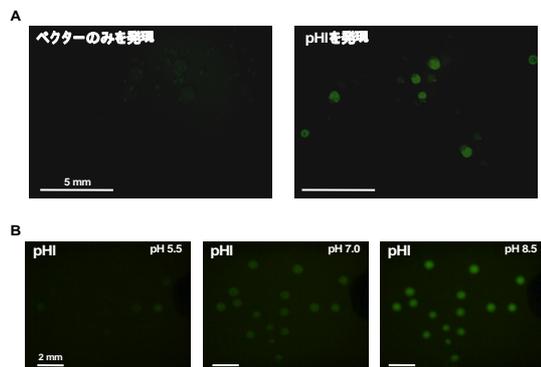


図 3. A: 大腸菌のペリプラズムにベクターのみ (左側) および pHl (右側) を発現させ、中性環境で蛍光を観察。B: pHl をペリプラズムに発現させた大腸菌において、細胞外 pH を変化させた際の蛍光を観察。

これまで、で検討したような性質を有する pHl との融合体を用いても、目的とする KCNQ1 のエンドサイトーシスを検出できなかった。そのため、pH 感受性がより高い変異体が必要であるが、残念ながら、研究期間内にそのような変異体を得ることはできなかった。

本研究は、挑戦的萌芽研究として、刺激伝導系が維持された状態のランゲンドルフ灌流心臓を用いて、器官レベルで KCNQ1 の発現量変化を検出する系を確立することを目的として計画した。我々が明らかにしてきた受容体刺激による KCNQ1 のエンドサイトーシスが生理的・病態生理的意義を有することを明らかにするためには、培養細胞だけではなく、器官レベルの検討が必要である。pHl で期待する結果が得られなかった場合に、

もっとも大きなハードルは、GFP 変異体(pH 変化による蛍光強度変化が大きいもの)を得ることだと考えていたが、そのハードルを越えることができなかつた。しかしながら、そのような GFP 変異体を得ることができれば、器官レベルで膜蛋白のエンドサイトーシスを検出するということがばかりでなく、様々な実験において有用であると考えられるため、引き続き検討を行っていききたい。

#### 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 6 件)

Obara Y, Nagasawa R, Nemoto W, Pellegrino MJ, Takahashi M, Habecker BA, Stork PJ, Ichiyangi O, Ito H, Tomita Y, Ishii K, Nakahata N. ERK5 induces ankrd1 for catecholamine biosynthesis and homeostasis in adrenal medullary cells. *Cell Signal*. 2016 Mar;28(3):177-89. 査読有

Honda T, Obara Y, Yamauchi A, Couvillon AD, Mason JJ, Ishii K, Nakahata N. Phosphorylation of ERK5 on Thr732 is associated with ERK5 nuclear localization and ERK5-dependent transcription. 査読有

Wu M, Obara Y, Norota I, Nagasawa Y, Ishii K. Insulin suppresses  $I_{Ks}$  (KCNQ1/KCNE1) currents, which require  $\beta$ -subunit KCNE1. *Pflügers Archiv - Eur J Physiol*. 2014; 466: 937-946. 査読有

Susuki H, Kanemaru K, Ishii K, Ohkura M, Ohkubo Y, Iino M. Imaging intraorganellar  $Ca^{2+}$  at subcellular resolution using CEPIA. *Nat. Commun*. 2014; 5: 4153. 査読有

Ishii K, Wu M, Obara Y. Is PIP2 involved in the insulin effect? *Channels*. 2014; 8: 391-392. 査読有

[学会発表](計 29 件)

那須史明(石井邦明)、肺動脈血管平滑筋細胞に発現する内因性の  $Ca_v1.2$  はアゼルニジピンにより量的修飾を受ける。第 67 回日本薬理学会北部会、2016 年 9 月 30 日、札幌(北海道大学)

石井邦明、イオンチャネルに対する

インスリンの作用に  $PIP_2$  は関与しているか。第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 24 日、札幌(札幌コンベンションセンター)

神部良太(石井邦明)、Kv1.5 チャネルと Kir2.1 チャネルに対する高濃度グルコースの影響。第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 10 日、横浜(パシフィコ横浜)

岡本洋介(石井邦明)、ラット肺静脈心筋細胞における過分極活性型  $Cl^-$  電流の不整脈発生への寄与。第 89 回日本薬理学会年会、2016 年 3 月 9 日、横浜(パシフィコ横浜)

那須史明(石井邦明)、Cav1.2 はアゼルニジピンにより量的修飾をうける。第 66 回日本薬理学会北部会、2015 年 9 月 18 日、富山(富山国際会議場)

Nasu F(石井邦明)、Azelnidipine reduces cell-surface expression of Cav1.2 channel。第 30 回日本不整脈学会学術大会・第 32 回日本心電学会学術集会、2015 年 7 月 30 日、京都(国立京都国際会館)

那須史明(石井邦明)、アゼルニジピンは Cav1.2 チャネルの細胞膜発現量を減少させる。第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18 日、名古屋(名古屋国際会議場)

那須史明(石井邦明)、アゼルニジピンが Cav1.2 チャネルを量的に修飾する可能性について。第 24 回日本循環薬理学会、2014 年 12 月 5 日、山形(山形テルサ)

那須史明(石井邦明)、アゼルニジピンが Cav1.2 チャネルをインターナリゼーションする可能性について。第 65 回日本薬理学会北部会、2014 年 9 月 26 日、福島(コラッセ福島)

倉上和也(石井邦明)、Internalization of KCNQ1 by activation of the  $\alpha_1$  adrenergic receptor。第 31 回日本心電学会学術集会、2014 年 7 月 25 日、東京(ザ・プリンスパークタワー東京)

倉上和也(石井邦明)、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体刺激による KCNQ1 インターナリゼーションは受容体との複合体形成によらない。第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 20 日、仙台(仙台国際センター)

大島真悟（石井邦明）、インスリンによる Q1/E1 電流の抑制に PIP<sub>2</sub> が関与する可能性：第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 20 日、仙台（仙台国際センター）

〔その他〕  
ホームページ等

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Pharmacology/pharmacology/Top.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石井 邦明 (ISHII KUNIAKI)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号：10184459

##### (2) 研究分担者

永澤 悦伸 (NAGASAWA YOSHINOBU)  
東邦大学・薬学部・講師  
研究者番号：40513057