

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 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590235

研究課題名（和文）ヒト K チャンネルの受容体刺激によるエンドサイトーシスの可能性と情報伝達機構の解明

研究課題名（英文）Endocytosis of human K channel by receptor activation and its intracellular mechanisms

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

研究成果の概要（和文）：

Gq 蛋白共役型受容体（GqPCR）の刺激によって、 I_{Ks} （遅延整流性 K^+ 電流のうち遅く活性化成分）が、どのように影響を受けるか、特にチャンネル蛋白のエンドサイトーシスが起るのかどうかについて検討した。 I_{Ks} チャンネルは KCNQ1/KCNE1 複合体として形成される。

1. 共焦点レーザー顕微鏡を用いた検討によって、 AT_1 受容体の刺激が KCNQ1（主サブユニット）のエンドサイトーシスを起こすことが示唆された。
2. 変異体ならびに薬理的阻害剤を用いた検討によって、 AT_1 受容体の刺激による KCNQ1 のエンドサイトーシスは、クラスリン依存性であり、PKC の活性化が関与している可能性が考えられた。また、ユビキチン化の関与はないものと思われた。
3. α_{1A} および α_{1B} 受容体の刺激によって、KCNQ1 のエンドサイトーシスが起ることが明らかになった。しかし、 AT_1 受容体の場合とは異なり、クラスリン依存性であるが、PKC の活性化は関与しないものと思われた。また、ユビキチン化の関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The slowly activating delayed rectifier K^+ channel (I_{Ks} channel) is composed of KCNQ1 and KCNE1 subunits. The present study was designed to investigate whether activation of Gq protein-coupled receptor (GqPCR) caused endocytosis of the I_{Ks} channel.

1. Effects of GqPCR activation on localization of the pore-forming subunit KCNQ1 were investigated by confocal laser scanning microscopy. It was suggested that AT_1R activation resulted in endocytosis of KCNQ1.
2. AT_1R -induced endocytosis of KCNQ1 was clathrin-dependent, where PKC activation was involved. Ubiquitination of KCNQ1 seemed to have nothing to do with the endocytosis.
3. Activation of α_{1A} and α_{1B} receptor obviously caused endocytosis of KCNQ1. Although α_1AR -induced endocytosis of KCNQ1 was clathrin-dependent, it did not require PKC activation in contrast to AT_1R . Involvement of ubiquitination of KCNQ1 was suggested.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
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・薬理学一般

キーワード：電位依存性 K チャネル・エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

電位依存性イオンチャネルは、神経・筋肉など興奮性細胞の活動に必須の役割を演じており、そこを流れる電流の変化は、細胞の興奮性に大きな影響を与える。電位依存性イオンチャネルの修飾機構としては、チャネル分子のリン酸化による機能的な修飾が最も良く研究されている。それに対し、細胞膜発現量の増減、すなわちチャネルの量的な調節機構に関する研究ははるかに遅れており、本研究開始当初において、ある種の電位依存性イオンチャネルが受容体刺激やチャネル遮断薬によってエンドサイトーシスされるという報告が散見される程度であった。

ヒト心室筋の再分極に寄与している I_{Ks} チャネル(遅延整流性 K^+ チャネルの遅く活性化成分)は主サブユニット KCNQ1(Q1)と副サブユニット KCNE1(E1)で形成され、Q1、E1 の遺伝子変異は致死的不整脈を引き起こす QT 延長症候群の原因になるなど、心筋の興奮性に大きな影響を与えている。我々は、培養細胞の発現系を用いて、アンジオテンシン受容体 1 型 (AT_1 受容体) の活性化によって I_{Ks} (Q1/E1 電流) が抑制され、それとともに Q1 蛋白がエンドサイトーシスされる可能性を示唆する実験データを得ていた。

2. 研究の目的

発現系において AT_1 受容体の活性化が I_{Ks} 電流を抑制することは電気生理学的に明らかであった。しかし、生細胞を用いて形態学的に観察した Q1 蛋白の局在変化は、緑色蛍光蛋白 (GFP) でラベルした Q1 蛋白のものであり、それが間違いなくエンドサイトーシスであるのかについては検討の余地があった。本研究の目的は以下のとおりである。

- (1) AT_1 受容体などの Gq 蛋白共役型受容体 (GqPCR) 刺激によって、Q1 が実際に、エンドサイトーシスされるのかどうかを明らかにする。
- (2) GqPCR 刺激による、Q1/E1 電流の電気生理学的変化、および Q1 の局在変化に関わる細胞内情報伝達機構について明らかにする。
- (3) 異なる GqPCR による Q1 のエンドサイトーシスに関して、その程度および機序の類似点・相違点を明らかにする。
- (4) 培養細胞レベルで、Q1 が刺激によりエンドサイトーシスされることが確実となった場合、その生理的意義を明らかにするた

めに、チャネルのエンドサイトーシスを組織レベルで観察する方法について検討する。

3. 研究の方法

- (1) 哺乳動物培養細胞への発現
Q1 (およびその変異体)、E1、ならびに GqPCR 受容体 (AT_1 受容体あるいは α_1 受容体) を HEK293 細胞にトランスフェクトし、発現させた。
- (2) ツメガエル卵母細胞への発現
Q1 (およびその変異体)、E1、ならびに GqPCR 受容体 (AT_1 受容体あるいは α_1 受容体) から cRNA を合成し、ツメガエル卵母細胞にインジェクトすることによって、それらを発現させた。
- (3) 電気生理学的方法
① HEK293 細胞の場合、パッチクランプ法を用いて全細胞電流を測定し、受容体刺激による影響を検討した。なお、安定した電流の測定のために、穿孔パッチ法を行う必要があった。
② 卵母細胞の場合、2 電極膜電位固定法を用いて全細胞電流を測定した。
- (4) イメージング法
細胞膜表面に発現している Q1 をラベルする目的で、Q1 の細胞外領域 (具体的には、第 1 - 2 膜貫通領域を繋ぐグループ) に Halo-Tag を付加したもの (Q1-Halo) を作製した。その Q1-Halo と E1 および受容体を HEK293 細胞に同時に発現させ、細胞膜非透過性の HaloTag リガンドを用いて、細胞膜表面の Q1 のみをラベルした。その後、受容体刺激を行ない、その際の Q1-Halo 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。
- (5) 分子生物学的方法
各種変異体の作製には、PCR 法を用いた。
- (6) 生化学的方法
ウエスタンブロット等は常法に従った。

4. 研究成果

- (1) AT_1 受容体刺激による Q1/E1 電流の抑制ならびに Q1 蛋白の局在変化
① AT_1 受容体刺激によって、両発現系において、Q1/E1 電流が抑制されることが明らかになった (図 1)。
② Q1 のカルボキシ末端 (C 末端) には PY モチーフ (ユビキチンリガーゼ Nedd4 による認識に関わる)、YXXΦ モチーフ (クラスリン依存性エンドサイトーシスに関わ

るアダプター蛋白 AP-2 が認識する) および PKC によるリン酸化可能部位が存在する。PY モチーフに変異を導入して検討したが、Q1/E1 電流は野生型と同じように修飾された。しかし、YXXΦ モチーフの変異体の場合、Q1/E1 電流の抑制は認められなかった。さらに、PKC 部位の4つに同時に変異を入れた変異体においても、Q1/E1 電流の抑制は認められなかった。

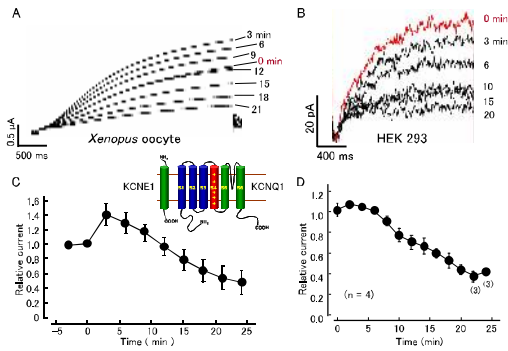


図 1. AT₁ 受容体刺激による Q1/E1 電流の修飾

③ GFP タグを導入した Q1 を用いたイメージングの結果は、電気生理学的方法による結果と一致するものであった。即ち、AT₁ 受容体刺激によって、野生型の Q1 および PY モチーフの変異体はエンドサイトーシスされ、YXXΦ モチーフの変異体および PKC 部位の変異体ではエンドサイトーシスが認められなかった (図 2)。

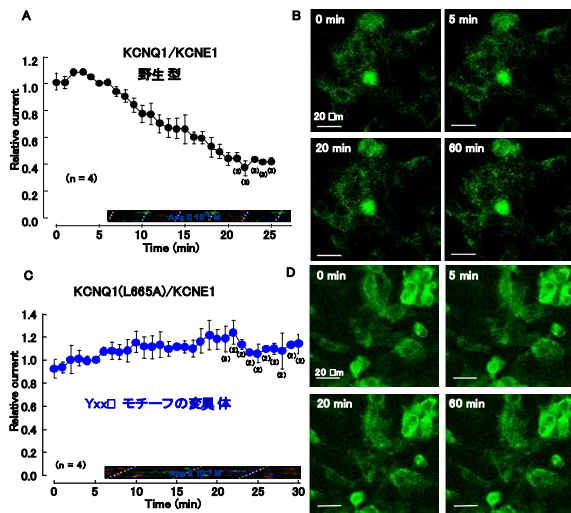


図 2. AT₁ 受容体刺激による Q1/E1 電流の抑制と Q1 の局在変化。A, B: 野生型、C, D: YXXΦ モチーフ変異体、GFP タグによる検討。

理由は不明であるが、 α_1 受容体の場合 (後述) と異なり、HaloTag を用いた検討では、未だ明確な結論が得られていない。

④ 薬理的な阻害薬を用いた検討から、エンドサイトーシスへの PKC 活性化、なら

びにダイナミンの関与が考えられた。

(2) α_1 受容体刺激による Q1 蛋白の局在変化
① α_{1A} 受容体の活性化によって、Q1 が明らかにエンドサイトーシスされることが、Halo-Q1 を用いた検討で示された。変異体について検討したところ、PY モチーフおよび YXXΦ モチーフの変異体とも、 α_{1A} 受容体の活性化によって、エンドサイトーシスを受けなかった。また、PKC 部位の変異体の場合は、エンドサイトーシスが認められた。これらの結果は、AT₁ 受容体の活性化によるものと異なっていた (図 3)。

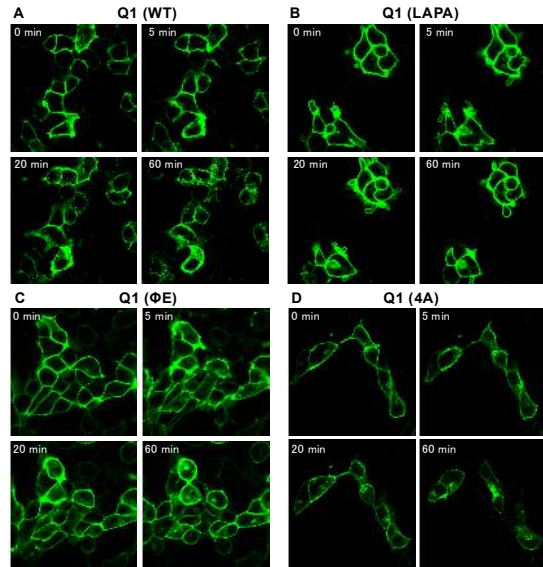


図 3. α_{1A} 受容体刺激による Q1 の局在変化。A: 野生型、B: PY モチーフ変異体、C: YXXΦ モチーフ変異体、D: PKC 部位の変異体。HaloTag を用いた検討。

② PKC 活性化が α_{1A} 受容体による Q1 のエンドサイトーシスに関与していないことが、阻害薬を用いた検討で示された。PY モチーフの変異体の結果から、ユビキチン化の関与の可能性が考えられたが、その点についての生化学的検証は未だ得られていない。また、ダイナミンの関与は AT₁ 受容体の場合と同様であった。

③ α_{1B} 受容体の活性化による影響に関しては、基本的な結果は、 α_{1A} 受容体の場合と同様であった。しかし、エンドサイトーシスの開始時間について、差がみられるようなデータも得られており、今後の検討が必要である。

(3) 組織レベルでエンドサイトーシスを観察する方法についての検討

pH 感受性緑色蛍光蛋白 (pHluorin) は酸性環境下で、その蛍光が減弱するという性質を有する。膜蛋白のエンドサイトーシスが起ると、その細胞外領域はエンドソーム内 (酸性) を向くこととなるため、それを利用することを考えた。pHluorin を Q1 の細胞外領域に付加した変異体を作製して検討したとこ

る、受容体刺激によって、蛍光量が減弱するデータが得られたが、大きな変化ではなく、また定量化も困難であった。この点に関しては、今後の更なる検討が必要である。

以上、本研究によって、AT₁受容体およびα₁受容体の活性化が、Q1のエンドサイトーシスを起こすことが明らかとなった。また、同じGqPCRによるエンドサイトーシスでも、その細胞内情報伝達機構は異なっている可能性があることが示唆された。受容体刺激による電位依存性K⁺電流の修飾機構としては、多くの場合、リン酸化による機能的な修飾であると考えられてきたが、本研究は、明らかな量的修飾が存在することを示したものである。今後、このような修飾が生理学的に意味を持つものかどうかを明らかにすることが、大きな課題として残されている。しかし、他のイオンチャネルにおいても、同様の修飾機構が認められる可能性も考えられ、細胞興奮性の調節を研究する上において、考慮すべき重要な現象を示すことが出来たと考える。

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9件)

- ① Kurakami K, Ishii K. Is a novel SCN3B mutation commonly found in SCN5A-negative Brugada syndrome patients? *Circ J* 77: 990-991, 2013. (査読有) DOI: 10.1253/circj.CJ-13-0242
- ② Obara Y, Yanagihata Y, Abe T, Dafik L, Ishii K, Nakahata N. Gα_h/transglutaminase-2 activity is required for maximal activation of adenylyl cyclase 8 in human and rat glioma cells. *Cell Signal* 25: 589-597, 2013. (査読有) DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.11.021
- ③ Ishii K, Norota I, Obara Y. Endocytic regulation of voltage-dependent potassium channels in the heart. *J Pharmacol Sci*. 124: 264-269, 2012. (査読有) DOI: 10.1254/jphs.12R12CP
- ④ Yamazaki Y, Fujii S, Aihara T, Mikoshihara K. Activation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors during preconditioning low-frequency stimulation leads to reversal of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neurosci* 207: 1-11, 2012. (査読有) DOI: 10.1016/j.neuroscience. 2012.01.045

⑤ Suzuki Y, Yamazaki Y, Hozumi Y, Okada M, Tanaka T, Iseki K, Ohta N, Aoyagi M, Fujii S, Goto K. NMDA receptor-mediated Ca²⁺ influx triggers nucleocytoplasmic translocation of diacylglycerol kinase ζ under oxygen-glucose deprivation conditions, an in vitro model of ischemia, in rat hippocampal slices. *Histochem Cell Biol* 137: 499-511, 2012. (査読有) DOI: 10.1007/s00418-011-0907-y

⑥ Yamazaki Y, Sugihara T, Goto JI, Chida K, Fujiwara H, Kaneko K, Fujii S, Mikoshihara K. Role of inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors in the postsynaptic expression of guinea pig hippocampal mossy fiber depotentiation. *Brain Res* 1387: 19-28, 2011. (査読有) DOI: 10.1016/j.brainres.2011.02.088

[学会発表] (計23件)

- ① 倉上和也、α_{1A}およびα_{1B}アドレナリン受容体刺激によるKCNQ1のインターナリゼーション、第86回日本薬理学会年会、2013年3月22日、福岡(福岡国際会議場)
- ② 石井邦明、アンジオテンシン受容体1型およびα_{1A}受容体刺激によるKCNQ1のインターナリゼーション機構、第22回日本循環薬理学会、2012年11月30日、富山(富山国際会議場)
- ③ 石井邦明、Gq蛋白共役型受容体によるQ1/E1チャネルのエンドサイトーシス、第29回日本心電学会学術集会、2012年10月13日、千葉(幕張メッセ国際会議場)
- ④ 山崎良彦、Facilitative effects of oligodendrocytes depolarization on the axonal conduction in the white matter of murine hippocampus. 第35回日本神経科学大会、2012年9月20日、名古屋市(名古屋国際会議場)
- ⑤ 山崎良彦、Modulatory effects of perinterneuronal oligodendrocyte on interneuronal firing in CA1 region of rat hippocampus. 第89回日本生理学会大会、2012年3月29日、松本市(長野県松本文化会館)
- ⑥ 呉明華、インスリンによるKCNQ1/KCNE1電流の抑制にはKCNE1が必須である、第85回日本薬理学会年会、2012

年3月15日、京都（国立京都国際会館）

- ⑦ 吳 明華、インスリンによる KCNQ1/KCNE1 電流の修飾メカニズム、第41回日本心脈管作動物質学会、2012年2月10日、秋田（秋田キャッスルホテル）
- ⑧ 吳 明華、インスリンによる I_{Ks} 電流の修飾における KCNE1 の関与、第62回日本薬理学会北部会、2011年9月29日、仙台（江陽グランドホテル）
- ⑨ 石井邦明、 I_{Ks} チャネルの修飾機構: 質的修飾と量的修飾. 第27回日本心電学会学術集会、2010年10月9日、大分（iichiko 総合文化センター）
- ⑩ 吳 明華、Effects of insulin on KCNQ1/KCNE1 channel expressed in *Xenopus* oocytes、第61回日本薬理学会北部会、2010年9月10日、札幌（札幌コンベンションセンター）
- ⑪ 蔦川修生、 α_{1A} アドレナリン受容体刺激によるインターナリゼーション KCNQ1 インターナリゼーションのメカニズム、第61回日本薬理学会北部会、2010年9月10日、札幌（札幌コンベンションセンター）
- ⑫ Tsutakawa Shusei, Internalization of KCNQ1 protein by activation of AT1 receptor and α_1 adrenergic receptor, XX World Congress ISHR, May 16, 2010, Kyoto (Kyoto International Conference Center)

[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

山崎 良彦 (YAMAZAKI YOSHIHIKO)
山形大学・医学部・准教授
研究者番号：10361247