

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 4 月 25 日現在

機関番号： 34417
 研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22590218
 研究課題名（和文）
 K⁺チャンネルの分解による発現量制御
 研究課題名（英文）
 Regulation of expression of K⁺ channel by degradation
 研究代表者
 岡田 誠剛（OKADA MASAYOSHI）
 関西医科大学・医学部・講師
 研究者番号： 40334677

研究成果の概要（和文）：イオンチャンネルの発現量は、合成だけでなく分解によっても制御されている。内向き整流性 K⁺チャンネル(Kir2.1)は、心、血管、神経、免疫系に発現し、細胞の興奮性、シグナル伝達に関与するが、分解による発現制御は未解明である。これまで、タンパク分解の研究は、放射性同位元素や、タンパク合成阻害剤が用いられ、in vivo での研究は困難であった。我々は、2種の蛍光タンパク(SNAP-タグ、蛍光タイマー(FT))を用いて、Kir2.1の分解が、同チャンネルの発現量(電流量)に応じて変化し、電流量をホメオスタティックに制御していること、並びに、蛍光タンパクを用いたタンパク分解分析法の有用性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We examined the regulation of degradation of strongly inwardly rectifying potassium channel (Kir2.1), using new techniques of fluorescent proteins, i. e., SNAP-tag and fluorescent timer (FT). We found the half-life of Kir2.1 changes depending on the expression level, namely current level. Patch-clamp recording showed that the cultivation under the blockade of the channel increased the whole cell conductance of Kir2.1. These results suggest the homeostatic degradation of Kir2.1 in the 293T cells, and the usefulness of fluorescence-based methods for examining the degradation of ion channels.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・一般生理

キーワード：内向き整流性 K⁺チャンネル、分解、ホメオスタティック制御

1. 研究開始当初の背景

イオンチャンネルの発現量の異常は細胞機能の障害を来すため、発現量は厳密に制御されている。チャンネル発現量は合成のみならず、分解にも制御されており、分解制御の不全はリドル症候群などの疾患の原因となる。内向き整流性 K⁺チャンネル(Kir2.1)は、心、血管、

神経、免疫系に発現し、興奮性を制御するとともに、シグナル伝達に関与している。Kir2.1遺伝子の欠損は、心室性不整脈や、顔貌の異常をきたす。逆に、Kir2.1をマウスに過剰発現させると、心房性の不整脈を来す。これらの結果は、Kir2.1の発現量が厳密に制御されていることを示しているが、分解が発現量調

節にどのように関与しているかは未解明である。

SNAP タグは、本来は DNA 修復酵素の活性ドメインであるが、特定の基質に共有結合するため、特異的な蛍光色素によるラベリングをすることができる。蛍光タイマー(FT)は、赤色蛍光タンパクの変異体であるが、最初緑色蛍光タンパクとして合成され徐々に赤色に変換するため、蛍光色の緑/赤比で FT 融合タンパクの合成からの時間をモニターすることができる (図 1)。

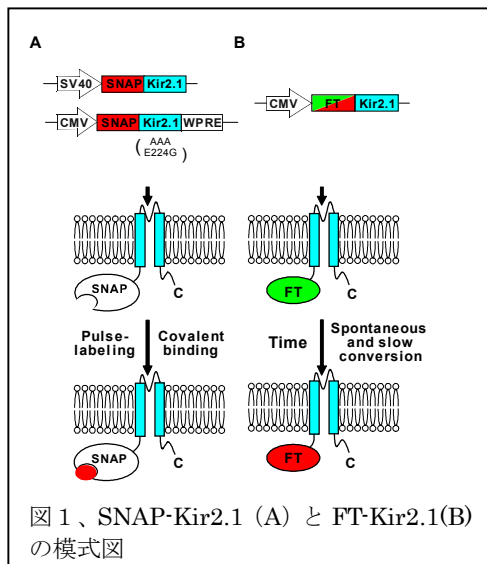


図 1、SNAP-Kir2.1 (A) と FT-Kir2.1(B) の模式図

我々はこれまでに、レトロウイルスベクターを用いて、Kir2.1 チャンネルを幼弱ラットの海馬歯状回の顆粒細胞に発現させてきた。レトロウイルスによる発現は、導入されたコピー数、溶原化した染色体の位置効果により、細胞にごとに大きく異なることが予想されるが、Kir 電流の発現量は、細胞によってばらつきが認められず、ほぼ同一であった(図 2)。

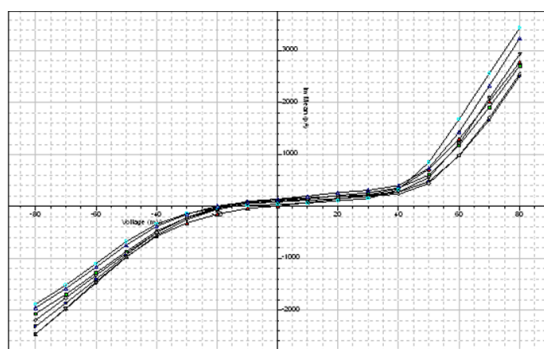


図 2、海馬ニューロンに発現させた Kir2.1 電流の均一性。レトロウイルスベクターを用いてラット海馬歯状回顆粒細胞に Kir2.1 を発現させ、7 個の細胞から全細胞記録し、-150 から 10 mV における電圧・電流曲線を重ねた。

このような発現量の均一性は、神経細胞のみならず、腎由来の HEK293T 細胞にも認められ、Kir2.1 と緑色蛍光タンパク(GFP)を同細胞に共発現させると、GFP 発現は大きくばらついたが、Kir 発現のばらつきは小さかった(図 3)。これらの結果から、研究代表者は Kir2.1 の発現量は、分解によっても制御されているという仮説を立てた。

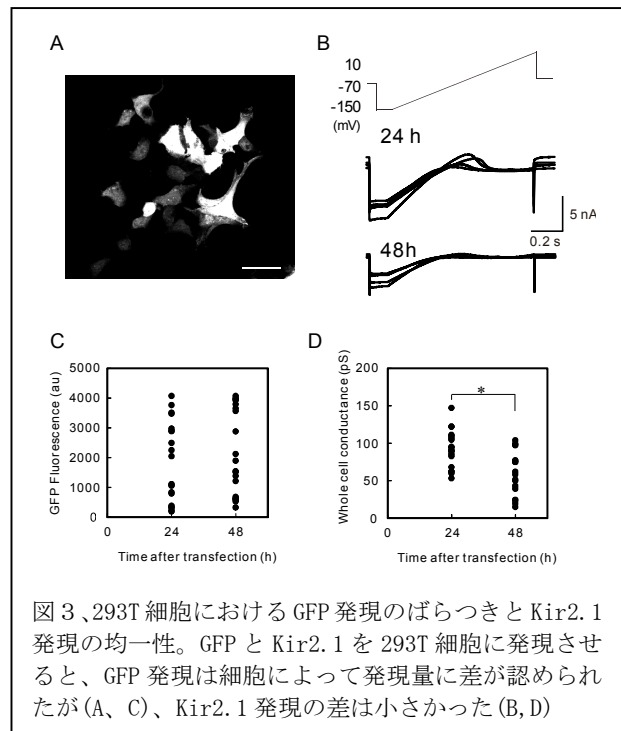


図 3、293T 細胞における GFP 発現のばらつきと Kir2.1 発現の均一性。GFP と Kir2.1 を 293T 細胞に発現させると、GFP 発現は細胞によって発現量に差が認められたが(A、C)、Kir2.1 発現の差は小さかった(B、D)

2. 研究の目的

本研究は、SNAP タグ、FT の 2 種の蛍光タンパクを用いて、Kir2.1 の分解の制御を培養細胞で検討し、新規蛍光タンパクを用いたタンパク分解の解析方法の有用性を検証する。並びに、in situ、in vivo に適用することを試みる。

3. 研究の方法

Kir2.1cDNA の 5' に SNAP タグ、及び、FT の遺伝子を融合させた(図 1)。In vitro の実験では、プロモーター活性が高い CMV プロモーター及び弱い SV40 プロモーターの下流に SNAP-Kir2.1、及び FT-Kir2.1 の融合遺伝子を挿入したプラスミドを HEK293T 細胞にリン酸カルシウム法で導入した。蛍光観察は、オリンパス社製共焦点顕微鏡を用いた。SNAP ラベリングは、SNAP-Cell1-TMR-Star (2 μ M) 存在下で 45 分間培養したのち、PBS で洗浄し、さらに 2 時間通常の培地で培養した。

in situ 発現のため、レンチウイルスベクター用の発現プラスミドに SNAP-Kir2.1 遺伝子を挿入し、既報(Okada and Matsuda, 2008)のようにレンチウイルスベクターを調製し、生後 7 日齢のラットから調製した培養海馬ス

ライスに Eppendorf 社製 Femtojet を用いて神経細胞層に注入した。7 日後、SNAP タグ特異的蛍光色素をスライス上に滴下した。

電気生理記録は、カバーガラス上に培養した 293T 細胞に遺伝子を導入し、正立顕微鏡に設置したチャンバー内に静置し、Axon200B を用いて全細胞記録した。

4. 研究成果

(1) SNAP タグによる Kir2.1 の半減期測定、及び、発現(電流)量に応じた変化

① 電流量に応じた SNAP-Kir2.1 半減期の変化

Kir2.1 の発現量が分解によって制御されていることを検討し、蛍光タンパクによる分解をモニターする方法の有用性を検討するため、SNAP-Kir2.1 融合タンパクを 293T 細胞に、活性の強い CMV プロモーターと弱い SV40 プロモーターを用いて発現させ、24 時間後に SNAP タグ特異的に共有結合する SNAP-Cell-TMR-Star でパルスラベルした。予想通り、SNAP-Kir2.1 タンパク発現量の差が認められ、CMV プロモーターで発現させた細胞の蛍光量が 5 倍高かった。継時的に蛍光の減衰を観察すると、SV40 の半減期は 35.1 ± 2.2 時間であったのに対し、CMV は、 18.2 ± 1.9 時間であった(図 4)。

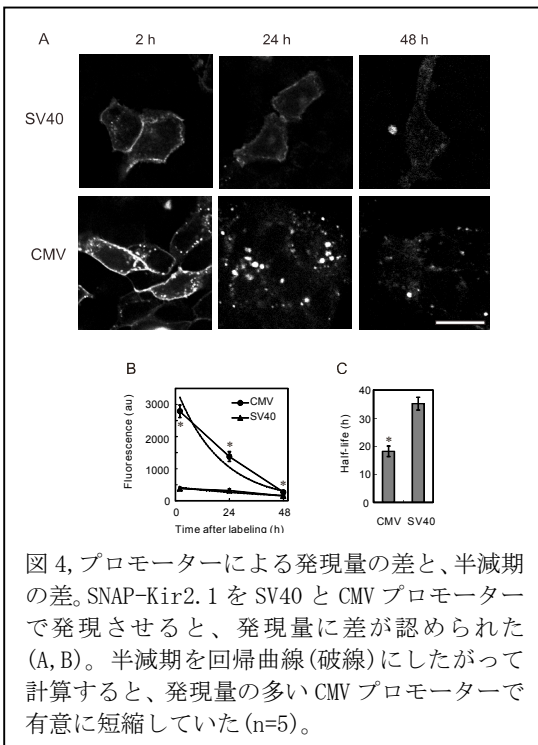


図 4, プロモーターによる発現量の差と、半減期の差。SNAP-Kir2.1 を SV40 と CMV プロモーターで発現させると、発現量に差が認められた(A, B)。半減期を回帰曲線(破線)にしたがって計算すると、発現量の多い CMV プロモーターで有意に短縮していた(n=5)。

この発現量に応じた半減期の変化が、Kir2.1 タンパク量、あるいは、電流によるのかを明らかにするため、CMV プロモーターで SNAP-Kir2.1 を発現する細胞に Kir2.1 選択的な遮断薬である Ba^{2+} (0.3 mM) を添加した。電流遮断は半減期を 38.8 ± 3.8 時間に延長した

(図 5)。また、電流を透過しない Kir2.1 のドミナント・ネガティブ体の半減期は、 34.9 ± 3.2 時間であり、 Ba^{2+} による遮断と同等であった。逆に、外向き電流を透過しやすい変異体である Kir2.1-E224G の半減期は、 9.6 ± 0.7 時間まで短縮しており、Kir2.1 の分解速度は、電流量によって制御されていることが明らかになった。

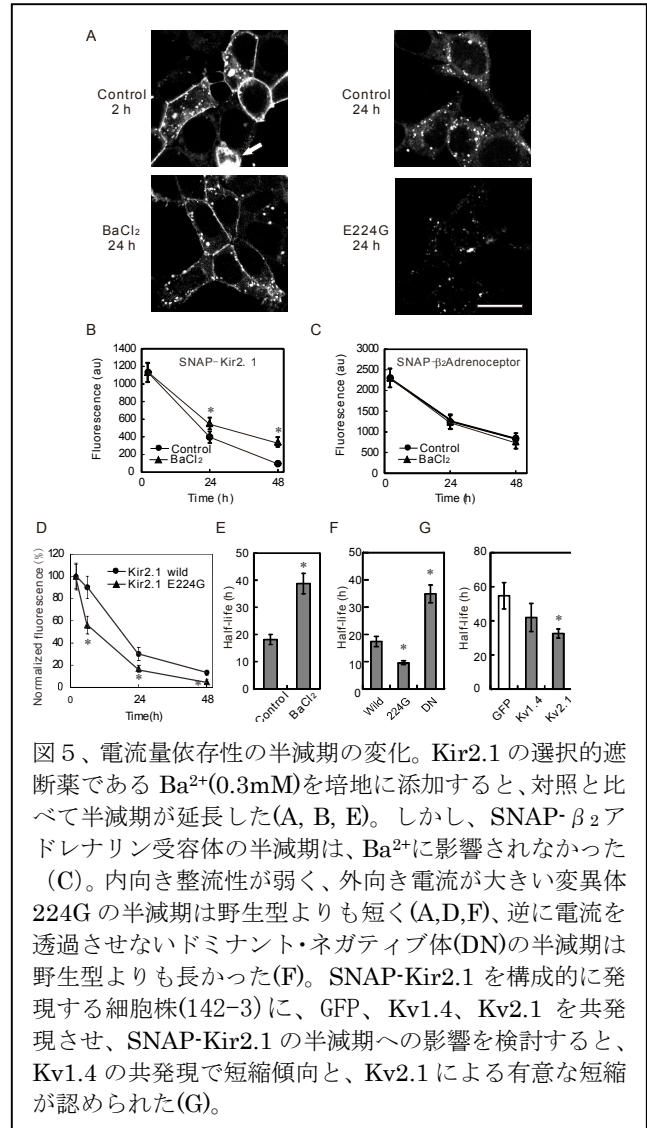


図 5、電流量依存性の半減期の変化。Kir2.1 の選択的遮断薬である Ba^{2+} (0.3mM) を培地に添加すると、対照と比べて半減期が延長した(A, B, E)。しかし、SNAP- β_2 アドレナリン受容体の半減期は、 Ba^{2+} に影響されなかった(C)。内向き整流性が弱く、外向き電流が大きい変異体 224G の半減期は野生型よりも短く(A, D, F)、逆に電流を透過させないドミナント・ネガティブ体(DN)の半減期は野生型よりも長かった(F)。SNAP-Kir2.1 を構成的に発現する細胞株(142-3)に、GFP、Kv1.4、Kv2.1 を共発現させ、SNAP-Kir2.1 の半減期への影響を検討すると、Kv1.4 の共発現で短縮傾向と、Kv2.1 による有意な短縮が認められた(G)。

膜電位が半減期を制御している可能性を検討するため、CMV 及び SV40 プロモーターで Kir2.1 を発現させた細胞の膜電位を測定したが、差は認められず、膜電位ではなく、電流量をモニターする機序が 293T 細胞にも存在するものと考えられる。

② 電流量に応じた電流量の変化

K⁺チャンネルの分解が発現量に応じて変化することを機能的な Kir2.1 チャンネル発現量を制御しているかを検討するため、発現量が多い CMV プロモーターと、少ない SV40 プロモーターを用いて、SNAP-Kir2.1 を 293T に発現させ、全細胞記録によって Kir 電流を測定し、電気生理的に検討した(図 6)。遺伝子導入 24 時間後には、CMV プロモーター Kir2.1 電流の方が大きかったが、48 時間後には両者間に差はなく、電流量に応じた分解速度の変化が機能的なチャンネル量を制御していることが示唆された。さらに、Ba²⁺ 存在下で SNAP-Kir2.1 発現細胞を培養すると、対照細胞よりも電流量は、24、48 時間後のいずれでも増加しており(図 7)、チャンネル遮断による半減期の延長がチャンネル量を増加させたことが示唆された。このように、電流量に応じた Kir2.1 チャンネル分解の調節が機能的な Kir2.1 チャンネル発現量をホメオスタティックに制御されていることが示唆された。

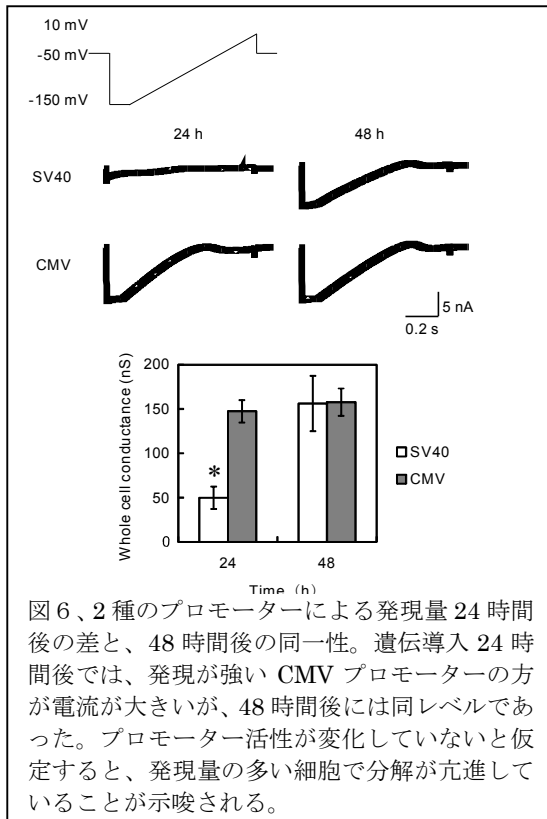


図 6、2 種のプロモーターによる発現量 24 時間後の差と、48 時間後の同一性。遺伝子導入 24 時間後では、発現が強い CMV プロモーターの方が電流が大きいが、48 時間後には同レベルであった。プロモーター活性が変化していないと仮定すると、発現量の多い細胞で分解が亢進していることが示唆される。

他の K⁺チャンネルの共発現が Kir の分解を促進するかを検討するため、SNAP-Kir2.1 を構成的に発現する 293T 細胞株 142-3 を樹立し、同細胞株に電位依存性 K⁺チャンネル Kv1.4 と Kv2.1 を一過性に共発現させ、SNAP-Kir2.1 の半減期を対照の GFP 共発現細胞と比較した。Kv1.4 共発現による SNAP-Kir 半減期の減少傾向と、Kv2.1 による半減期の有意な短縮が認められ、他の K⁺チャンネル共発現によるヘテロ

な分解の促進が認められた(図 5G)。

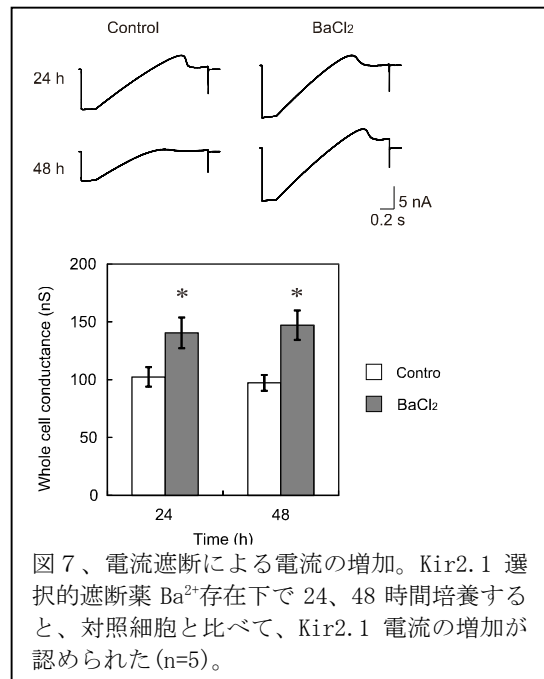
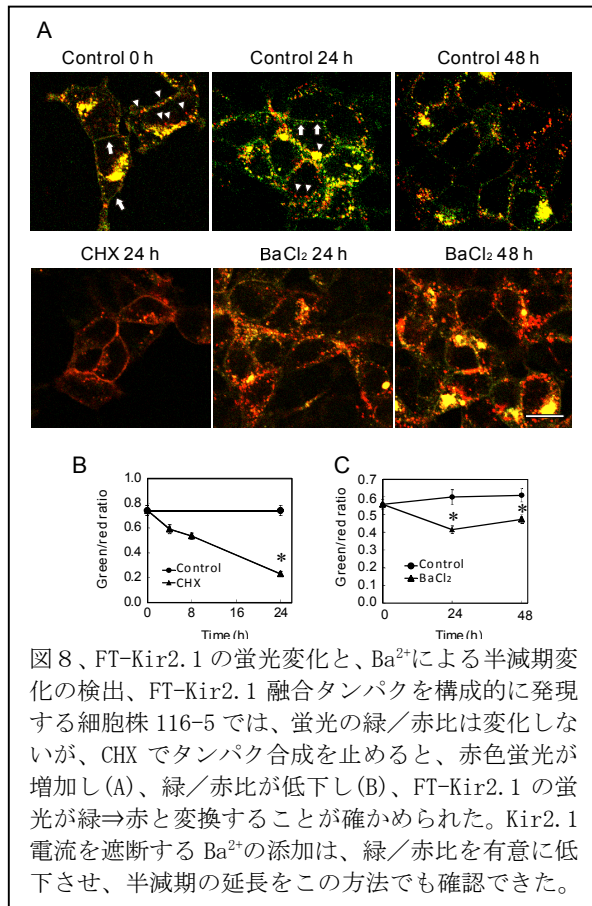


図 7、電流遮断による電流の増加。Kir2.1 選択的遮断薬 Ba²⁺ 存在下で 24、48 時間培養すると、対照細胞と比べて、Kir2.1 電流の増加が認められた (n=5)。

(2) FT による分解速度変化の検出の検証

FT は緑色蛍光タンパクとして合成され、漸次赤色に変換するため、(緑/赤)の割合を測定すれば、FT-Kir2.1 融合タンパクの「若さ」の指標となり、タンパクの半減期の変化を検出できることが期待される。これを確かめるため、FT-Kir2.1 融合タンパクを構成的に発現する細胞株 116-5 を樹立した。まず、タンパク合成を阻害するサイクロヘキシミド (CHX, 10 μM) を添加すると、(緑/赤)比は有意に低下し、若さの指標となることが示された。次に、Kir2.1 の半減期を延長した Ba²⁺ を培地に添加すると、緑/赤比は有意に低下し、Kir 電流の遮断による半減期の延長が FT を用いても確かめることができた。また、本法が半減期の変化の検出に有用であることが示唆された。



(3) In situ 及び in vivo への応用

これら2つ蛍光タンパクを用いた方法が、in situ 及び in vivo に適用できるかを検討するため、FT-Kir2.1を発現するレンチウイルスベクターを作製し、ラット海馬(in vivo)と培養海馬スライス(in situ)に注入した。しかし、FT-KIR2.1の蛍光は微弱であり、293T細胞では検出できたが、自家蛍光が強いin vivo や in situ での検出は困難であった。ニューロンでの発現量が多いカルシウムカルモジュリンキナーゼ(CaMKII)とFTの融合タンパクも作成し、培養スライスに発現させたが、同様に蛍光が暗く、検出は困難であった。FTの蛍光強度を上昇させる工夫が将来的に必要なである。

次に、レンチウイルスベクターでSNAP-Kir2.1をin situ で発現させ、SNAPタグと特異的に共有結合する蛍光色素SNAP-Cell-TMR-Starをスライス上に滴下してパルスラベルしたところ、神経細胞の細胞体、樹状突起に蛍光が認められ、in situ での蛍光タギングに成功した(図9)。

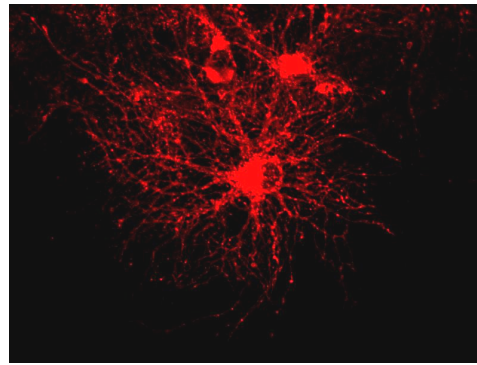


図9、SNAP-Kir2.1のin situ 発現。ラット海馬スライス培養に、SNAP-Kir2.1を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、7日後にSNAP-Cell-TMR-Starで蛍光タギングした。

in vivo タギングのために、ラット海馬にレンチウイルスベクターを注入し、7日後にSNAP-cell-TMR-Starを脳室内に注入したが、蛍光陽性細胞は認められなかった。発現量が多いシンドビスウイルスベクターで、SNAP-Kir2.1融合タンパクを発現させても、改善は認められず、脳室上皮の細胞が蛍光陽性になっていることから、蛍光色素の投与方法に問題があることが示唆された。これらの方法の将来の課題が明らかになった。

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3件)

① Okada M, Matsuda H, Okimura Y (2013) Lentiviral and Moloney Retroviral Expression of Green Fluorescent Protein in Somatotrophs In Vivo. PLoS ONE 8(1): e54437.

doi:10.1371/journal.pone.0054437

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0054437>

② Matsuda H, Hayashi M, Okada M (2010) Voltage-dependent block by internal spermine of the murine inwardly rectifying K⁺ channel, Kir2.1, with asymmetrical K⁺ concentrations. J Physiol (London) 588: 4673-4681.

doi: 10.1113/jphysiol.2010.194480.

<http://jp.physoc.org/content/588/23/467>

3. long

③Lin CW, Sim S, Ainsworth A, Okada M, Kelsch W, Lois C (2010) Genetically increased cell-intrinsic excitability enhances neuronal integration into adult brain circuits. *Neuron* 65; 32-39.

doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.001.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627309009787>

〔学会発表〕 (計 3 件)

①Masayoshi Okada, Masataka Kano, Hiroko Matsuda, Current-dependent degradation of inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. Gordon Research Conference on “Cell Biology of the Neuron,” June 24-29, 2012, Waterville Valley, NH, USA.

②岡田誠剛、松田博子、内向き整流性 K⁺チャネルを発現するレンチウイルスベクターのタイターは調製時のチャネル遮断で上昇する。日本生化学会、近畿支部会、2011年5月21日、守口、大阪府

③加納真孝、岡田誠剛、松田博子、発現量に応じた Kir2.1 タンパク分解の亢進; 蛍光タンパクを用いた測定、日本生理学会、2010年5月19日～5月21日、盛岡、岩手県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 誠剛 (OKADA MASAYOSHI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：40334677

(2) 研究分担者

松田 博子 (MATSUDA HIROKO)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：10181736

(3) 連携研究者

()

研究者番号：