

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461109

研究課題名(和文) Hsp70によるLQT2由来変異HERG蛋白成熟化の二重品質管理機構と治療応用

研究課題名(英文) The role of Hsp70 in quality control of mutant hERG protein associated LQT2 and its therapeutic application.

研究代表者

李 佩俐 (Li, Peili)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40464292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞に発現する変異hERGチャネルは変異蛋白の分解が亢進することで心室性不整脈を引き起こすため、その治療は変異蛋白の分解を阻止することにある。Histone deacetylase (HDAC) 汎阻害剤とHDAC6特異阻害剤(TBA)は野生型又変異型hERG蛋白と電流を増加し、特に変異hERG蛋白の成熟化に成功した。ノックダウンHDAC6又TBAはhERG蛋白のアセチル化を増強し、ユビキチン化を抑制することで、hERG蛋白の半減期を延長し、細胞膜での発現およびhERG電流を増加した。HDAC6の強発現は逆の現象を確認した。hERG蛋白のアセチル化される三つlysines 残基を特定した。

研究成果の概要(英文)：LQT2 results from the mutations in hERG causing reduced hERG protein expression on cell membrane and hERG currents. We found a novel role of histone deacetylase (HDAC) 6 in hERG. Three HDAC pan-inhibitors, a HDAC6 selective inhibitor (TBA) or knockdown of HDAC6 increased wild-type (WT) protein expression and induced two mutant hERGs' maturation with enhanced the acetylation of hERG protein, whereas, decreased the ubiquitin with prolonged half-life. Co-expression of HDAC6 posed opposite effects on hERG. Immunocytochemistry and electrophysiological studies confirmed the results. Substitutions of the three lysine residues (116, 495 and 757) with arginine in hERG erased the effects of HDAC6 on hERG protein level, acetylation and ubiquitination levels, respectively. TBA treatment enhanced the expression of hERG in mouse cardiomyocytes HL-1, increased IKr and shortened action potential duration. The results indicate HDAC6 regulates hERG by altering acetylation/ubiquitination of hERG proteins.

研究分野：循環器内科学

キーワード：LQT2 hERG histone deacetylase 6 acetylation ubiquitination lysine

1. 研究開始当初の背景

LQT2 は hERG 遺伝子変異により hERG 蛋白が不安定化し、ユビキチン化を受けることで、プロテアソーム (UPS) で分解されるために、心筋細胞膜での蛋白発現と hERG 電流が減少し、活動電位期間の延長から早期抗脱分極を引き起こし、致死性心室性不整脈を引き起こす病態である。UPS を介した小胞体関連分解を抑制できれば、変異 hERG 蛋白が安定化し、小胞体やゴルジ体での蛋白折りたたみや糖鎖修飾を介して変異 hERG 蛋白が成熟化することを促進することができ、LQT2 の治療薬の開発にこの概念を応用できると考えられる。

我々はこれまでの分子シャペロン研究を通じて、Heat shock protein (Hsp) が UPS 系を抑制、成熟チャネル蛋白を増加させるという研究結果を得てきた。Hsp70 が Hsc70 並びに hERG 蛋白との相互作用を抑制し、小胞体関連分解を遮断することで hERG 蛋白が安定化並びに成熟化を促進する、又 Hsp90 は E3 リガーゼ CHIP を介して hERG 蛋白の分解を抑制することを見出してきた。以上から分子シャペロンは LQT2 患者由来変異 hERG 蛋白を安定化するのみならず成熟化も可能である。

Histone deacetylases (HDAC) はエピジェネティクスによる転写制御と細胞質蛋白のアセチル化による蛋白の翻訳後修飾を起こすことが知られている。人 HDAC は 4 つのクラスに分類され、class は Hsp70 と結合し、class に属する HDAC6 は Hsp90 の機能を調節することが報告された。近年、HDAC 阻害剤は cystic fibrosis を引き起こす変異チャネル CFTR を回復させることが報告された。分子シャペロンの hERG 蛋白に及ぼす作用に HDAC の関与があるか否かを検討するために、HDAC 汎阻害剤と HDAC 6 特異阻害剤 (TBA) が hERG 蛋白に及ぼす影響を検討した。HDAC 汎阻害剤と TBA は野生型および二つの変異 hERG 蛋白を増加したが、Hsp70 と Hsp90 の発現には影響しなかった。HDAC6 と hERG が結合す

ることは免疫沈降実験で明らかにしている。本研究は HDAC6 による hERG 蛋白の成熟化促進作用に関する分子機構を検討した。

2. 研究の目的

増強された UPS による変異 hERG 蛋白の分解を HDAC6 との機能共関との観点から検討し、その制御機構を明らかにする。さらに細胞膜での hERG 蛋白の発現とチャネル機能を増加する手段を見出し、新規 LQT2 の治療を目指す。

3. 研究の方法

1) HL-1 心筋細胞並びに HEK293 細胞培養と遺伝子導入

野生型 (WT) hERG および変異 hERG (G601S, R752W) の cDNA に FLAG タグを付けた真核発現ベクターを作成し、その遺伝子又 small interfering RNA (siRNA) HDAC6 導入は HEK293 にリポフェクタミン 2000 を用いて行い、そのお遺伝子導入効率は同時に導入した GFP の発現で評価された。遺伝子導入 24 時間後に細胞にそれぞれの HDAC 阻害剤や DMSO (control) (24 時間) を与えて、細胞の抽出物を用いて蛋白発現をウェスタンブロット法により測定した。マウス心房細胞株 HL-1 細胞を 4mM L-glutamine (Wako, Osaka, Japan) を加えた Claycomb medium (100 μ M norepinephrine, 100U/ml penicillin, 10% fetal bovine serum を含む) で 5%CO₂ インキュベータに 37 °C で培養した。

2) ウェスタンブロット法並びに免疫沈降法による発現蛋白の検出。

遺伝子導入後 48 時間に蛋白を回収。蛋白濃度は BCA 蛋白アッセイキットで測定した。蛋白を SDS-PAGE ゲルを用いて電気泳動 (200MV, 180mA) し、膜に転写 (180mA, 2 時間)。一次と二次抗体で室温 1 時間反応させた後、ECL キットを用いてそのシグナルを検出した。免疫沈降では免疫複合体は protein G

agarose ビーズで回集し、結合した蛋白をウェスタンブロット法で解析した。

3) レーザー顕微鏡を用いて免疫蛍光抗体による検討

細胞に遺伝子と細胞内局在マーカーを導入24時間後固定し、一次抗体室温で1時間、二次抗体でさらに1時間反応させる。レーザー顕微鏡を用いてシグナルを観察した。HDAC阻害剤の添加は24時間である。

4) ホールセルパッチクランプ法によるチャンネル電流と活動電位の測定

HEK293細胞に野生型と変異型hERGを導入し、安定発現株を樹立。その安定発現株およびHL-1細胞に遺伝子導入やHDAC阻害剤処理24時間後にホールセルパッチクランプ法を用いて膜電位および活動電位持続期間を記録した。

5) リアルタイムPCR

HEK293細胞から全RNAをRNeasy Plus Mini Kit(QIAGEN)で抽出し、逆転写後7900HT Fast Real-Time PCR Systemを用いてリアルタイムPCRした。

4. 研究成果

1). HDAC阻害剤は野生型と変異型hERG蛋白およびhERG電流を増加する

HDAC阻害剤のhERG蛋白レベルに及ぼす効果を検討するために、HEK293細胞に野生型と変異型hERG(G601S-FLAG, R752W-FLAG)をそれぞれ導入24時間後、HDAC阻害剤(TSA 0.1 μ M, SAHA 5 μ M, scriptaid 1 μ M)とHDAC6特異阻害剤Tubastatin A(TBA, 8 μ M)をそれぞれ添加し、添加24時間後にウェスタンブロット法で解析した。野生型hERGは小胞体中存在する未熟型(135kDa)とゴルジおよび細胞膜中存在する成熟型(155kDa)を検出できたが、変異型hERGは未熟型のみである。HDAC阻害剤とTBAは野生型hERG蛋白を増加し、変異hERGの未熟型のみならずとその成熟型蛋白を増加した。免疫沈降法を用いてhERG

蛋白と結合するHDACファミリーを検証したところ、hERG蛋白とHDAC6が結合することを見出した。HEK293細胞にhERG-FLAGを導入後、HDAC阻害剤とTBAの処理や、又siRNAによるHDAC6のノックダウン処理の24時間後にhERG mRNAをリアルタイムPCRで測定した。HDAC阻害剤はhERG mRNAを増加したが、TBAおよびHDAC6のノックダウンはhERG mRNAに影響は及ばなかった。HDAC阻害剤とTBA添加はHsp90およびHsp70に影響が及ばなかった。

以上の結果はHDACのhERG蛋白への作用はHDAC6を介してのpost-translation modificationと示唆された。

2). HDAC6によるhERG蛋白の安定性に及ぼす作用はhERG蛋白のアセチル化とユビキチン化を介する

hERGチャンネルでのHDAC6の効果を確認するために、HDAC6のノックダウン、TBA添加及びHDAC6の過剰発現がhERG蛋白発現に及ぼす作用をhERG-FLAGとの共発現系で検討した。HDAC6のノックダウンおよびTBA添加は野生型hERG蛋白ならびに変異型hERGの成熟型蛋白を増加した。一方HDAC6の強発現は野生型と変異型hERG蛋白の発現を抑制した。HDAC6とhERG蛋白の細胞内局在を免疫染色で確認した。HDAC6のノックダウンはhERG蛋白の小胞体および細胞膜での発現を増強した。野生型と変異型hERG(G601S-FLAG, R752W-FLAG)の安定発現HEK293細胞株を用いてホールセルパッチクランプ法によりhERG電流を測定した。HDAC6のノックダウンは野生型と変異型hERG-FLAG電流を増加した。HDAC6はユビキチンに關与するubiquitin zinc finger (BUZ) domainを有するために、BUZ domainの欠損変異HDAC6および野生型HDAC6それぞれとhERGを共発現し、hERG蛋白に及ぼす影響を検討した。野生型HDAC6のみhERG蛋白を減少したが、BUZ欠損HDAC6は

hERG 蛋白に作用しなかった。chase 実験を用いて、未熟型 hERG 蛋白の半減期を測定した。野生型 hERG 蛋白の半減期は 7.8 時間(h)、HDAC 6 のノックダウン下での半減期は 13.9h、HDAC 6 の過剰発現は 4.5h、TBA treatment は 10.9h となった。以上の結果は HDAC6 が hERG 蛋白のコピキチン化を促進してその半減期を減少することが示唆された。

Lysine 残基はアセチル化とコピキチン化両者の標的であるために、hERG 蛋白のアセチル化とコピキチン化を、HDAC 6 のノックダウン、HDAC6 強発現および TBA 添加の有無で検証した。HDAC 6 のノックダウンと TBA 添加は野生型および変異型 hERG 蛋白のアセチル化を増強、一方コピキチン化を抑制した。HDAC6 の強発現は hERG 蛋白のアセチル化を抑制し、コピキチン化を増加した

以上の結果は HDAC6 が hERG 蛋白のアセチル化とコピキチン化を制御することにより hERG 蛋白の安定性およびチャネル機能を調節するが判明した。

3). HDAC6 は hERG の lysine (116, 495 and 757) 残基をアセチル化する

hERG 蛋白に存在するアセチル化やコピキチン化される lysine 残基を決定するために、PHOSIDAシミュレーションによる lysine 残基候補を予測した。116, 495,757 の lysine 残基を arginine に置換した変異 hERG(triple lysine)ThERG-FLAG を作製し、HDAC 6 のノックダウン、HDAC6 の強発現および TBA 添加が ThERG に及ぼす効果を検討した。HDAC6 による ThERG 蛋白の減少効果が著しく低下、HDAC 6 のノックダウンと TBA 添加は ThERG 蛋白に影響を及ぼさなかった、HDAC6 の ThERG 蛋白のアセチル化並びにコピキチン化も顕著に減少された。

以上の結果は HDAC6 が hERG の 116, 495, 757 番 lysine 残基のアセチル化とコピキチン化を調節するによって hERG 蛋白の安定

性を制御することが示唆された。

4). HDAC6 の阻害はマウス心筋内在性 ERG 蛋白とチャネル機能を増強する

HDAC6 がマウス心筋細胞 HL-1 での内在性 ERG に影響及ぼすか否かを検討するために、HL-1 細胞に TBA を添加 24 時間後ウェスタンプロット法で ERG 蛋白を測定した。TBA 添加は ERG 蛋白を顕著に増加した。hERG 電流と相当する I_{Kr} 電流は増加され、活動電位持続期間は短縮された。

以上から hERG チャネル蛋白の安定性が hERG 蛋白の発現とチャネル機能に与える影響の分子機構として、HDAC6 による hERG 蛋白の特定の lysine 残基に対してのコピキチン化およびアセチル化が hERG 蛋白の安定性を調節し、HDAC6 阻害剤は変異 hERG の細胞膜での蛋白発現やその電流を増加することで、新規 LQT2 の治療薬と成り得る可能性があることを示唆された。HDAC 阻害剤は既に臨床現場で抗ガン剤として使用されているために人に投与可能である。今後は LQT2 の動物モデルを用いて HDAC 阻害剤の hERG チャネルに及ぼす効果を確認できれば、その LQT2 治療に関しての医師主導臨床試験に繋がると考えられる。

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 11 件)

1). Tatsufumi Sogo, Peili Li, *et al.*. Electrophysiological properties of iPS cell-derived cardiomyocytes from a patient with long QT syndrome type 1 harboring the novel mutant M437V of KCNQ1. *Regenerative Therapy*. 2016; 4: 9-17. 査読あり.

2). Endo R, Kurata Y, Li P, *et al.*

Stabilization of Kv1.5 channel protein by the inotropic agent olprinone. Eur J Pharmacol. 2015; 765:488-494. 査読あり.

3). Maharani N, Li P, *et al*. Molecular Mechanisms Underlying Urate-Induced Enhancement of Kv1.5 Channel Expression in HL-1 Atrial Myocytes. Circ J. 2015; 12:2659-2668. 査読あり.

4). Peili Li, *et al*. E3 ligase CHIP and Hsc70 regulate Kv1.5 protein expression and function in mammalian cells. J Mol Cell Cardiol. 2015; 86:138-146. 査読あり.

5). Utami SB, Mahati E, Li P, *et al*. Apoptosis induced by an uromodulin mutant C112Y and its suppression by topiroxostat. Clin Exp Nephrol. 2015; 4:576-584. 査読あり.

6). Sakata S, Kurata Y, Li P, *et al*. Instability of KCNE1-D85N that Causes Long QT Syndrome: Stabilization by Verapamil. Pacing Clin Electrophysiol. 2014; 7:853-863. 査読あり.

7). Shirayoshi Y, Hisatome I, *et al*. VEGF secretion by adipose tissue-derived regenerative cells is impaired under hyperglycemic conditions via glucose

transporter activation and ROS increase. Biomed Res. 2014; 6:397-405. 査読あり.

8). Endo R, Li P, *et al*. Bepridil Suppresses Apoptosis in HL-1 Cardiac Atrial Myocytes Expressing Mutant E334K cMyBPC. Yonago Acta Med. 2013; 4:93-95. 査読あり.

9). Iwai C*, Li P*, *et al*. Hsp90 prevents interaction between CHIP and HERG proteins to facilitate maturation of wild-type and mutant HERG proteins. * contributed equally Cardiovasc Res. 2013; 3:520-528. 査読あり.

10). Bahrudin U, Li P, *et al*. Simultaneous Treatment with Azelnidipine and Olmesartan Inhibits Apoptosis of HI-1 Cardiac Myocytes Expressing E334k cMyBPC. Drug Res (Stuttg). 2013; 10: 515-520. 査読あり.

11). Peili Li, Ichiro Hisatome, *et al*. AMP deaminase 3 plays a critical role in remote reperfusion lung injury. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2013; 434:131-136. 査読あり.

[学会発表](計22件)

1). Peili Li, Yasutaka Kurata, Nani Maharani, Endang Mahati, Kazuhiro Yamamoto, Ichiro Hisatome Epigenetic and post-translational modification of hERG to control the

channel protein expression and function
第 80 回日本循環器学会学術集会 2016 Mar
18-20th

宮城県仙台市 仙台国際センター

2). Peili Li, Nani Maharani, Endang Mahati,
Yasuaki Shirayoshi, Yasutaka Kurata,
Kazuhiro Yamamoto, Ichiro Hisatome
Histone deacetylase plays a pivotal role
in expression and function of wild-type
and mutant hERGs

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 July 28-31th
京都府 国立京都国際会館

3). Peili Li, Nani Maharani, *et al.*
Inhibition of histone deacetylase
enhances expression and function of
wild-type and mutant hERGs

The 79th annual scientific meeting of the
Japanese circulation society 2015 Apr
24-26th

大阪府大阪市 大阪国際会議場、グランフロ
ント大阪

4). Peili Li, Ichiro Hisatome, *et al.*
Hsp90 Promotes Maturation of
Wild-type and Mutant HERG Proteins
Via inhibition of CHIP interaction
第 29 回日本不整脈学会・第 31 回日本心電
学会合同学術大会 2014 Jul 22-25th
東京都 ザ・プリンスパークタワー東京, プ
リンスホテル

5). Peili Li, Chisato Iwai, *et al.*
Hsp90 Prevents Interaction between CHIP
and HERG Proteins to Facilitate
Maturation of Wild-type and Mutant HERG
Proteins

第 78 回日本循環器学会学術集会
2014 Mar 21-23th
東京都 東京国際フォーラム

6). Peili Li, Sulistiyati Bayu Utami,
Ichiro Hisatome.
Topiroxiostat improved the apoptpsis of
cells expressing Uromodulin Mutation
C112Y Causing Familial Juvenile
Hyperuricemic Nephropathy (FJHN)
第 47 回日本痛風・核酸代謝学会総会 2014
Feb 20-21th
兵庫県 神戸国際会議場

7). Peili Li, Masaru Kato, *et al.*
E3 ligase CHIP interacts with Hsc70 to
regulate Kv1.5 expression and
repolarization in HL-1 cells
第 30 回日本心電学会学術集会 2013 Oct
11-12th
青森県青森市 リングステーションホール
青森

以後省略

6 . 研究組織

(1)研究代表者

李 佩俐 (Li Peili)
鳥取大学 医学系研究科 助教
研究者番号 : 40464292

(2)研究分担者

白吉 安昭 (Shirayoshi Yasuaki)
鳥取大学 医学系研究科 准教授
研究者番号 : 90249946

(3)連携研究者

池田 信人 (Ikeda Nobuhito)
鳥取大学 医学系研究科 助教
研究者番号 : 50620316