

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670719

研究課題名(和文) 蝸牛血管条辺縁細胞におけるスフィンゴミエリンによるKCNQ1の調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of KCNQ1/KCNE1 by sphingomyelin synthase

研究代表者

宋 文杰 (Wen-Jie, Song)

熊本大学・生命科学研究部・教授

研究者番号：90216573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、スフィンゴミエリン(SM)代謝によるK⁺チャネルであるKCNQ1の発現制御が示唆されている(Lu et al., 2012)。本研究は、これを細胞レベルで証明するために行われた。主な結果：1) SM合成酵素(SMS1)阻害剤であるD609の投与により、KCNQ1/KCNE1電流密度が低下した。2) SMS1shRNAにより、電流密度が減少し、電位依存性は変化しなかった。3) SMS1の過剰発現はshRNAと逆の効果を齎した。4) PKD阻害剤がshRNAと同様に電流を抑制し、両者が非加算的であった。よって、SMS1によってKCNQ1/KCNE1が正に制御されることが初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We previously showed that sphingomyelin synthase (SMS) deficiency leads to a reduction in expression of the K⁺ channel KCNQ1 in the inner ear, causing hearing loss. Here, we examined whether manipulation of SMS1 activity affects KCNQ1/KCNE1 currents in single cells. Application of tricyclodecan-9-ylxanthogenate, a nonspecific inhibitor of SMSs, significantly reduced current density and altered channel voltage dependence. Knockdown of SMS1 by a short hairpin RNA, however, reduced current density alone. Consistent with this, overexpression of SMS1 increased the current density without changing channel properties. Furthermore, application of protein kinase D inhibitors also suppressed current density without changing channel properties; this effect was nonadditive with that of SMS1 short hairpin RNA. These results suggest that SMS1 positively regulates KCNQ1/KCNE1 channel density in a protein kinase D-dependent manner.

研究分野：神経科学

キーワード：KCNQ1/KCNE1 スフィンゴミエリン PKD

1. 研究開始当初の背景

蝸牛障害による難聴の予防と治療は耳科学の中心課題である。脂質は細胞機能に重要であるにも拘らず、これまで内耳機能における脂質に関する研究は極めて少ない。申請者らがスフィンゴ脂質であるスフィンゴミエリンと聴覚の関係に注目し、スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS1) の欠損動物を解析した結果、内耳の異常による難聴が起きることを見出した (Lu et al., 2012)。難聴の原因として、SMS1 欠損動物における蝸牛電位の顕著な低下を突き止めた。更に、蝸牛電位低下の原因として、蝸牛血管条における K⁺チャンネルである KCNQ1 の発現が著しく低下したことを突き止めた。これらのことは、スフィンゴミエリン代謝が KCNQ1 の発現を制御することを強く示唆する。

2. 研究の目的

KCNQ1 は内耳、心臓、膵臓などにおいて、KCNE1 と複合体チャンネルを形成し、聴覚のみならず、心機能や膵機能などにも重要な働きをしているため、その調節機序を解明することは重要である。そこで、本研究では、上記背景を踏まえて、スフィンゴミエリン代謝が KCNQ1/KCNE1 チャンネルを調節するか否か、調節する場合、どのような仕組みで調節するのかを明らかにすることを研究目的とした。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、単一細胞で研究する戦略を採用した。なぜなら、組織や全動物標本では、細胞・組織間の相互作用などの間接的な要因を排除できないためである。また、スフィンゴミエリン代謝活性の操作はその合成酵素である SMS1 の操作を通じて行うことにした。具体的には、HEK293T 細胞に KCNQ1/KCNE1 を発現させ、SMS1 活性を操作した場合に、KCNQ1/KCNE1 チャンネルにどのような変化が起きるかを調べる。チャンネルの密度や性質はホールセル記録法で調べた。

4. 研究成果

KCNQ1/KCNE1 を発現していない HEK293T 細胞 (対照群) と発現させる細胞 (実験群) の K⁺電流を調べたところ、対照群では、低レベルの電流しかなく、実験群の 15%程度であった。また、電流の性質も異なり、実験群に見られた典型的な KCNQ1/KCNE1 電流 (ゆっくりとした活性化と脱活性化) は対照群では全く見られなかった。従って、HEK293T 細胞は KCNQ1/KCNE1 チャンネルを調べる良い発現系であることが言える。

SMS1 の活性を操作するために、まずその阻害剤 D609 の効果を調べた。D609 を 6 時間投与すると、KCNQ1/KCNE1 電流が著しく抑制され、またチャンネルの電位依存性が大きく過分極側にシフトした。すなわち、脱分極性刺激に対して、KCNQ1/KCNE1 チャンネルがより開きやすくなった。これらの結果は SMS1 活性が

KCNQ1/KCNE1 チャンネルの密度と性質を調節することを示唆する。

しかし、D609 は SMS1 に対する特異性が低いことが知られている。より特異的に SMS1 活性を操作するために、SMS1 に対する shRNA の効果を調べた。shRNA プラスミドにより、SMS1 の mRNA レベルが低下したが、SMS2 の mRNA レベルは影響を受けなかった。shRNA を導入した細胞では、KCNQ1/KCNE1 電流密度が統計的に有意に低下した。また、電圧コンダクタンス密度関係をボルツマン関数で近似し、最大コンダクタンス密度を算出したところ、やはり shRNA によって有意に減少した。一方、チャンネルの電位依存性に有意な変化は見られなかった (図 1)。

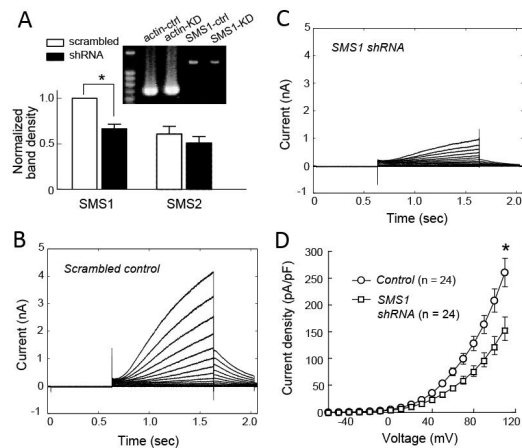


図 1. SMS1 shRNA によって、KCNQ1/KCNE1 のチャンネル密度は低下し、電位依存性は変化しなかった。

逆に、SMS1 を過剰発現させる、KCNQ1/KCNE1 電流密度が増加し、チャンネルの電位依存性に変化は見られなかった (図 2)。

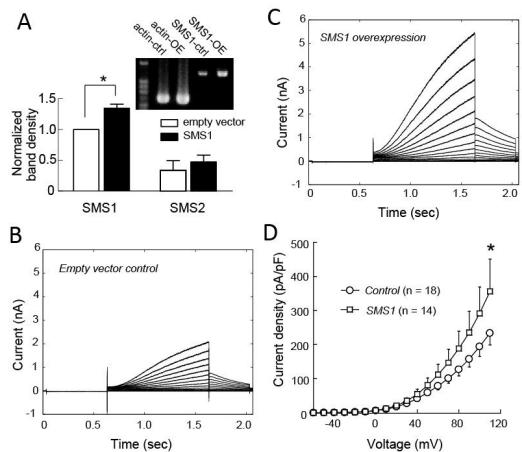


図 2. SMS1 の過剰発現により、KCNQ1/KCNE1 電流密度が増加し、電位依存性は変化しなかった。

上記の結果を合わせて考えると、SMS1 は KCNQ1/KCNE1 チャンネルの密度を高める作用を有する一方、チャンネルの性質を変えないことが言える。D609 によるチャンネル電位依存性変化は、恐らく SMS1 以外の酵素に対する効果によると考えられる。また、D609 がチャンネルに直接作用する可能性も否定できない。いずれにせよ、本研究で見出した SMS1 による KCNQ1/KCNE1 チャンネルの正の制御は世界で初めての知見で、SMS1 を制御することで、難聴や心疾患を治療する新しい道が開かれたと言える。

では、SMS1 はどのような仕組みで KCNQ1/KCNE1 チャンネルを調節しているのだろうか？SMS1 はチャンネルの密度を増加させ、性質を変えなかったことから、形質膜におけるチャンネルタンパク質の密度のみを調節すると考えられるため、細胞内タンパク輸送に SMS1 が関わるのではないかと考えた。SMS1 がホスファチジルコリンとセラミドからジアシルグリセロール (DAG) とスフィンゴミエリンを生成する反応を触媒する。これらの分子のいずれも KCNQ1/KCNE1 チャンネルの調節に関わる可能性があるが、ここで DAG に注目した。その理由は DAG 依存性キナーゼ D (PKD) が膜タンパクの輸送に関わることが以前の研究から報告されているためである。PKD 阻害剤を投与すると、KCNQ1/KCNE1 電流密度が減少した。複数種類の阻害剤が同一の抑制効果をもたらしたため、PKD が KCNQ1/KCNE1 チャンネル密度を調節する可能性が強く示唆された。また、SMS1 shRNA と PKD 阻害剤を、それぞれ単独で、また同時に投与した場合の効

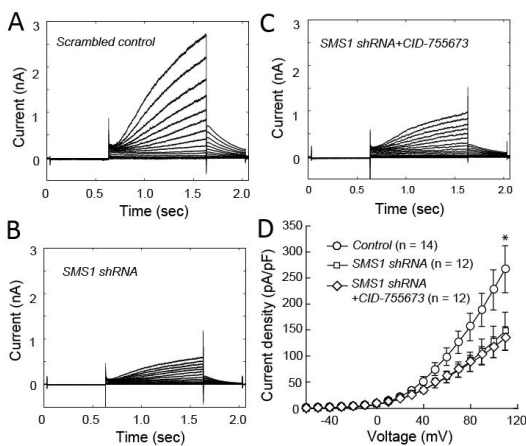


図3 . SMS1 shRNA の効果と PKD 阻害剤の効果が非加算的であった。

果を調べた結果、両者の抑制効果が非加算的であることが明らかとなった (図3)。従って、PKD が SMS1 の下流で働く可能性が支持された。

結論として、本研究によって、SMS1 によって KCNQ1/KCNE1 チャンネルが正に制御されることが世界で初めて明らかにされた。また、そのメカニズムとして、SMS1 DAG PKD

KCNQ1/KCNE1 の経路を作業仮説として提示することができた。本研究の成果は主に American Journal of Physiology-Cell Physiology に発表した (Wu et al., 2016)。

<引用文献>

Lu M-H, Takemoto M, Watanabe K, Luo H, Nishimura M, Yano M, Tomimoto H, Okazaki T, Oike Y, Song W-J. Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. The Journal of Physiology, 2012, 590(Pt 16):4029-44.

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 4 件)

Wu MK, Takemoto M, Taniguchi M, Takumi T, Okazaki T, Song W-J. Regulation of membrane KCNQ1/KCNE1 channel density by sphingomyelin synthase 1. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 査読有、2016 (in press). DOI: 10.1152/ajpcell.00272.2015

Nishimura M, Sawatari H, Takemoto M, Song W-J. Identification of the somatosensory parietal ventral area and overlap of the somatosensory and auditory cortices in mice. Neurosci Res, 99, 査読有、2015, 55-61. DOI: 10.1016/j.neures.2015.06.001.

Nishimura M, Song W-J. Greenwood frequency-position relationship in the primary auditory cortex in guinea pigs. NeuroImage, 89, 査読有、2014, 181-191. DOI:10.1016/j.neuroimage.2013.12.014

Takemoto M, Hasegawa K, Nishimura M, Song W-J. The insular auditory field receives input from the lemniscal subdivision of the auditory thalamus in mice. J Comp Neurol, 522(6)、査読有、2014, 1373-1389. DOI: 10.1002/cne.23491

[学会発表](計 10 件)

Meikui Wu, Makoto Takemoto, Makoto Taniguchi, Toru Takumi, Toshiro Okazaki, Wen-Jie Song. Regulation of Membrane KCNQ1/KCNE1 Channel Density by Sphingomyelin Synthase 1. The 2nd

Annual Meeting of the Society for Bioacoustics. 2015年12月12日~2015年12月13日. Fukuoka.

Masataka Nishimura and Wen-Jie Song. A binaural compensatory mechanism in the auditory system: enhanced cortical response to a sound to the ipsilateral ear in a stream of binaural sounds. The 2nd Annual Meeting of the Society for Bioacoustics. 2015年12月12日~2015年12月13日. Fukuoka.

Huan Luo, Kayoko Hasegawa, Wen-Jie Song. Characterization of a group of neurons with specific location in layer 2 of mouse temporal cortex. The 2nd Annual Meeting of the Society for Bioacoustics. 2015年12月12日~2015年12月13日. Fukuoka.

Masataka Nishimura, Yuta Shiromi, Wen-Jie Song. Mating related interactive vocal communication with sub-centisecond precision in guinea pigs. 39th Annual Midwinter Meeting of Association for Research in Otolaryngology. 2016年02月20日~2016年02月24日. San Diego.

Takemoto M, Hasegawa K, Song WJ. Anatomical study on neural circuits of the mouse insular auditory field. The 92th annual meeting of the physiological society of Japan. 2015年03月21日~2015年03月23日,神戸国際展示場.

Wen-Jie Song, Masataka Nishimura. Greenwood frequency-position relationship as revealed by optical imaging in guinea pig primary auditory cortex. International conference on auditory cortex. 2014年09月13日~2014年09月17日. Magdeburg, Germany.

Wu MK, Takemoto M, Okazaki T, Song W-J. Regulation of KCNQ1/KCNE1 Channels by Sphingomyelin Synthase 1. Inner ear biology workshop. 2014年11月01日~2014年11月04日. 京都国際会館.

Wen-Jie Song. Functional organization of the auditory cortex revealed by application of in vivo voltage-sensitive dye imaging. 第91回日本生理学会大会、2014年03月16日~2014年03月18日、鹿児島大学.

Chi Wang, Makoto Takemoto, Wen-Jie Song. Cortico-cortical connections of the insular auditory field in mice. 第91回日本生理学会大会、2014年03月16日~2014年03月18日、鹿児島大学.

Wen-Jie Song, Masataka Nishimura. Quantitative frequency-position relationship in the primary auditory cortex in guinea pigs. 第91回日本生理学会大会、2014年03月16日~2014年03月18日、鹿児島大学.

〔図書〕(計 3 件)

宋文杰、MEDSI社、カンドル神経科学 (Principles of Neural Science, Fifth Edition)第31章 聴覚中枢神経系(訳)、2013.

宋文杰、脳科学辞典、周波数地図、2013.

宋文杰、脳科学辞典、聴覚野、2013.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://srv02.medic.kumamoto-u.ac.jp/dep t/physiol2/physiol2.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

宋文杰(Wen-Jie Song)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号: 90216573

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：