

# 論文内容要旨

論文題目

Internalization of KCNQ1 channel by activation of the  $\alpha_1$  adrenergic receptor

$\alpha_1$  アドレナリン受容体刺激による KCNQ1 インターナライゼーション機構の解明

責任講座：耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

氏名：倉上 和也

## 【内容要旨】(1,200字以内)

【背景・目的】KCNQ1/KCNE1 チャンネルは、緩徐活性型の遅延整流性カリウムチャンネルであり、心室筋活動電位の終結に重要な役割を果たしており、KCNQ1/KCNE1 チャンネルの遺伝子異常が、致死的不整脈を引き起こす QT 延長症候群の原因であることが知られている。イオンチャンネルの活性は、質的・量的変化によって制御されているが、電位依存性チャンネルにおける受容体刺激による量的修飾については未だ明らかになっていない部分が多い。我々は以前、AT<sub>1</sub> 受容体刺激によって KCNQ1 がインターナライズすること、 $\alpha_{1A}$  アドレナリン受容体 ( $\alpha_{1A}AR$ ) 刺激により、KCNQ1 のインターナライゼーションが惹起されることを報告している。しかしながら、その責任部位やメカニズムについては未だ明らかでない部分が多い。本研究では、 $\alpha_1AR$  刺激による KCNQ1 のインターナライゼーションに関与するモチーフを同定し、そのメカニズムを解明することを目的とした。

【方法】細胞外部位である S1-S2 領域に HaloTag を付加した KCNQ1 とヒト  $\alpha_1AR$  を HEK293 細胞およびラット仔心筋細胞に発現させた。細胞膜非透過性蛍光 HaloTag リガンドを用い、細胞膜上に発現している KCNQ1 のみを標識し、フェニレフリン (PE) 刺激による細胞内局在の変化について、共焦点レーザー顕微鏡を用いた living cell imaging 法により解析を行った。インターナライゼーション時の KCNQ1 と受容体の局在の検討では、HA-tag を付加した  $\alpha_1AR$  を発現させ、HaloTag リガンドと HA 抗体による二重染色を行った。電気生理学的検討には、アフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いた。

【結果・考察】HEK 細胞、ラット仔心筋細胞のいずれにおいても、 $\alpha_{1A}AR$  および  $\alpha_{1B}AR$  刺激によって、KCNQ1 の明らかなインターナライゼーションが観察された。KCNQ1 の C 末端にある PY モチーフの変異体、YXX $\Phi$  モチーフの変異体ともに、細胞膜上の KCNQ1 (変異体) のインターナライゼーションは起こらなかった。このことから、 $\alpha_1AR$  刺激による KCNQ1 のインターナライゼーションには、ユビキチン化およびアダプター蛋白 AP2 が関与している可能性が示唆された。また、 $\alpha_1AR$  自体のインターナライゼーションに関しては、 $\alpha_{1A}AR$  では明らかな受容体自体のインターナライゼーションは認められなかった。 $\alpha_{1B}AR$  の場合は PE 刺激によってインターナライズすることが確認されたが、KCNQ1 との局在一致は認められなかった。このことは、KCNQ1 が  $\alpha_1AR$  との複合体としてインターナライゼーションされている可能性は低いことを示唆している。KCNQ1 のユビキチン化やインターナライゼーション後に KCNQ1 がどのような経路を辿るのかについては、今後さらなる検討が必要である。

平成26年1月23日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

## 学位論文審査結果報告書

申請者氏名: 倉上 和也

論文 題目:  $\alpha_1$  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機構の解明

審査 委員: 主査 後藤 薫   
副査 石井 邦明   
副査 欠畑 誠治 

審査終了日: 平成26年1月23日

### 論文審査結果要旨

KCNQ1/KCNE1 チャンネルは緩徐活性型の遅延整流性カリウムチャンネルであり、心室筋活動電位の終結に重要な役割を果たす。このチャンネルの遺伝子異常は致死的不整脈を引き起こすQT 延長症候群の原因となることが報告されているが、その制御メカニズムには未だ不明な点が多い。倉上氏は、KCNQ1 の制御メカニズムのうち量的制御機構に関して、アドレナリン受容体刺激後のインターナリゼーションのメカニズムを解析した。

本研究では、タグ標識 KCNQ1 とアドレナリン受容体 (AR) を HEK293 細胞およびラット仔心筋細胞に発現させ、フェニレフリン刺激による KCNQ1 の細胞内局在の変化を形態学的に解析し、また電気生理学的解析にはアフリカツメガエル卵母細胞の発現系を用いた実験を行った。その結果、倉上氏は以下の結果を得た:

- 1) HEK 細胞およびラット仔心筋細胞のいずれにおいても、 $\alpha_{1A}$ AR および  $\alpha_{1B}$ AR 刺激によって、KCNQ1 の明らかなインターナリゼーションが観察された。
- 2) KCNQ1 の C 末端にある PY モチーフ (ユビキチン E3 リガーゼ Nedd4 結合部位) および YXX  $\Phi$  モチーフ (アダプター蛋白 AP2 結合部位) に変異を導入すると、これらの変異体におけるインターナリゼーション現象は消失した。
- 3) フェニレフリン刺激によるアドレナリン受容体自体のインターナリゼーションを解析すると、 $\alpha_{1A}$ AR のインターナリゼーションは認められなかった。一方、 $\alpha_{1B}$ AR の場合はインターナライズされることが確認されたが、KCNQ1 との局在一致は認められなかった。

本研究は、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にはユビキチン化およびアダプター蛋白 AP2 が関与する可能性を明らかにし、KCNQ1 チャンネルの関与する病態の解明に貢献するものと考えられた。よって学位審査委員会は本研究が博士 (医学) の授与に値するものと判定した。